

NN 8201,349

~~100 349~~

C

# KOELHUISGEBREKEN VAN BOTER

COLD STORAGE DEFECTS OF BUTTER

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD  
VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS, IR. W. F. EJSVOOGEL,  
HOGLERAAR IN DE HYDRAULICA, DE BEVLOEIING,  
DE WEG- EN WATERBOUWKUNDE EN DE  
BOSBOUWARCHITECTUUR  
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN  
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT  
VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN  
OP WOENSDAG 26 JUNI 1963 TE 16 UUR

DOOR

J. KOOPS

UITGEVERIJ CERES - MEPPEL

1511 = 104864-03

BIBLIOTHEEK  
DER  
LANDBOUWHOGESCHOOL  
WAGENINGEN

Aan Prof. Dr. H. MULDER en verder aan al degenen die hebben medegewerkt aan mijn wetenschappelijke vorming of mij op enigerlei wijze hebben geholpen bij het tot stand komen van dit proefschrift, betuig ik mijn hartelijke dank.

De onderzoekingen werden uitgevoerd in het Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek (NIZO) te Ede. Gaarne wordt dank gebracht aan het Bestuur van dit instituut voor de toestemming het werk in deze vorm uit te geven en aan Prof. Dr. J. W. PETTE, Hoofddirecteur van het NIZO, voor zijn medewerking en belangstelling bij het totstandkomen van dit proefschrift.

De daadwerkelijke steun ondervonden van de zijde van de Fa. R. BUISMAN te Leeuwarden wordt bijzonder gewaardeerd.

## STELLINGEN

## I

Gezouten boter uit gezuurde room verdient méér belangstelling dan ze op het ogenblik ondervindt.

## II

De door MOHR gegeven verklaring voor de invloed van koper en van de pH op het ontstaan van koelhuisgebreken van boter, is niet juist.

W. MOHR & K. KOENEN, Die Butter. Milchw. Verlag Th. Mann. K. G. Hildesheim 1958, p. 144, 147 en 333.

## III

Aan de „salt-balance”-theorie van SOMMER en HART met betrekking tot de hitte-stabiliteit van melk en geëvaporeerde melk wordt veelal méér betekenis gehecht dan haar toekomst.

H. H. SOMMER & E. B. HART, J. Biol. Chem. 40 (1919) 137.  
D. ROSE, Dairy Sci. Abstr. 25 (1963) 45.

## IV

De introductie van de „suggested practical allowance” door een FAO/WHO Expertgroup is, in het licht van de reeds bestaande opvattingen over het normbegrip in de voedingsleer, overbodig.

Calcium Requirements. WHO Techn. Rep. Ser. No. 230 (1962).

## V

Tot nu toe is niet aangetoond dat bacteriefugatie van consumptiemelk voordelen biedt.

P. SIMONART, Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 13 (1959) 100.  
P. SIMONART, R. POFFÉ & M. WECKX, Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 16 (1962) 81.

## VI

Het vergelijken van bedrijfsresultaten betreffende kaasopbrengst en netto ondermelkwaarde houdt gevaren in voor de kwaliteit van de kaas.

## VII

Het verschil tussen het vriespunt van melk en dat van melk-ultrafiltraat mag niet alleen worden toegeschreven aan partiële retentie van ionen tijdens het ultrafiltreren.

J. M. DE MAN, J. Dairy Research 29 (1962) 279.

## VIII

Tijdens langdurige bewaring van geëvaporeerde melk kan het gebrek „vetafscheiding” optreden. De opgeroomde vetbolletjes zijn niet gemakkelijk te redispergeren. Dit verschijnsel kan worden verklaard door de invloed van de zwaartekracht op de colloid-chemische stabiliteit van de melkvetbolletjes.

S. A. TROELSTRA, Philips Techn. Tijdschr. 12 (1950) 297.

## IX

De bepaling van het eiwitgehalte van melk volgens de fluorescentie-methode van KONEV en KOZUNIN is niet geschikt voor massaonderzoek van melk van individuele koeien.

S. V. KONEV & I. I. KOZUNIN, Zhivotnovodstvo 21 (1959) (5) 43.

F. LANG, Dairy Sci. Abstr. 23 (1961) 103.

P. F. D'YACHENKO, Mol. Prom. 1963 (4) 7.

## X

De juistheid van de mening van CAMPBELL en PETERSEN dat bij oraal gebruik van antilichamen-bevattende koemelk (verkregen door infusie van antigenen in de uier van de koe) bij de mens immuniteit ontstaat, moet worden betwijfeld.

B. CAMPBELL & W. E. PETERSEN, Milchwissenschaft 14 (1959) 467.

## XI

De mening van VAN DER WAARDEN dat fosfatiden bij pH 4,6 méér koper binden dan bij pH 6,8 is onvoldoende gefundeerd.

M. VAN DER WAARDEN, Monographs on the Progress of Research in Holland. Elsevier Publ. Co. 1947, p. 190.

## XII

De veronderstelling van GREENBANK en PALLANSCH dat het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes primair uit eiwit bestaat, vindt onvoldoende steun in de resultaten van hun experimenten.

G. R. GREENBANK & M. J. PALLANSCH, J. Dairy Sci. 44 (1961) 1597.

*Aan mijn ouders*

DRUK: N.V. NOORD-NEDERLANDSE DRUKKERIJ - MEPPEL

Verschenen als proefschrift en als Verslag Nr. 80 van het Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek (NIZO) te Ede.

# INHOUD

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING . . . . .	1
HOOFDSTUK I. ENKELE BESCHOUWINGEN OVER DE OXIDATIEGEBREKEN VAN BOTER .	5
1. Algemeen overzicht . . . . .	5
2. Triglyceriden en/of fosfatiden als oorzaak van het ontstaan van koelhuis- gebreken . . . . .	7
2.1. Triglyceriden . . . . .	7
2.2. Fosfatiden . . . . .	9
2.3. Fosfatiden-triglyceriden als potentiële bron voor het ontstaan van koelhuisgebreken . . . . .	10
3. Oxidatieprodukten van onverzadigde vetzuren die reuk- en smaakafwijkingen veroorzaken . . . . .	10
4. Factoren die invloed uitoefenen op het ontstaan van koelhuisgebreken . .	13
4.1. Inleiding . . . . .	13
4.2. Redoxpotentiaal (Eh) en pH . . . . .	13
4.3. Metalen . . . . .	14
4.4. Pro- en antioxidanten . . . . .	16
4.4.1. Caroteen en vitamine A . . . . .	16
4.4.2. Vitamine E . . . . .	17
4.4.3. Vitamine C . . . . .	17
4.4.4. Diacetyl . . . . .	17
4.4.5. Vetperoxiden, vrije vetzuren en vocht . . . . .	18
4.5. Invloed van een enzym . . . . .	18
4.6. Temperatuurbehandeling van de room . . . . .	18
4.7. Het karntype en de bewerking van de boter . . . . .	19
4.8. Licht . . . . .	19
4.9. Zout . . . . .	20
4.10. Het wassen van de boter . . . . .	20
4.11. De bewaartemperatuur van de boter . . . . .	21
4.12. Het seizoen . . . . .	21
Conclusie . . . . .	22
HOOFDSTUK II. DE MELKFOSFATIDEN . . . . .	23
1. Inleiding . . . . .	23
2. Wijze waarop fosfatiden in de melk voorkomen . . . . .	23
3. Extractiemethoden . . . . .	24

3.1.	Literatuuroverzicht . . . . .	24
3.2.	Uitgangsmateriaal voor de isolatie van fosfatiden . . . . .	25
3.3.	Toegepaste isolatiemethoden . . . . .	26
3.3.1.	Isolatie van fosfatiden uit boterserum door middel van de methode Röse-Gottlieb (M1) . . . . .	26
3.3.2.	Isolatie van fosfatiden uit boterserum door middel van ethanol-tetrachloorkoolstof (M2) . . . . .	26
3.3.3.	Zuivering van het ruwe, niet met aceton behandelde tetraextract door middel van een chromatografische methode (M3) . . . . .	27
4.	Samenstelling van de fosfatiden . . . . .	28
4.1.	Inleiding . . . . .	28
4.2.	Eigen onderzoek . . . . .	28
4.3.	Experimentele bijzonderheden . . . . .	30
4.3.1.	Fosforbepaling in het Röse-Gottlieb-extract van boterserum, in tetraextracten en in hydrolysaten van fosfatiden . . . . .	31
4.3.2.	Overige bepalingen . . . . .	31
4.4.	Resultaten . . . . .	32
5.	Scheiding in componenten . . . . .	34
5.1.	Inleiding . . . . .	34
5.2.	Gevolgte methodiek . . . . .	35
5.2.1.	Het verwijderen van vet uit een gewassen, niet met aceton behandeld M2-extract . . . . .	35
5.2.2.	Scheiding van fosfatide-fracties uit een gewassen, niet met aceton behandeld M2-extract . . . . .	36
6.	Onverzadigde vetzuren in botervet, in fosfatiden en in de lecithine-, cefaline- en sfingomyeline-fractie . . . . .	37
6.1.	Inleiding . . . . .	37
6.2.	Eigen onderzoek . . . . .	39
HOOFDSTUK III. OXIDATIE VAN FOSFATIDEN EN VAN BOTERVET . . . . .		45
1.	Inleiding . . . . .	45
2.	De invloed van koper op het joodadditiegetal van de fosfatiden en van het vet . . . . .	46
2.1.	Werkwijze . . . . .	46
2.2.	Resultaten . . . . .	47
3.	Organoleptische proeven met geoxideerde fosfatide-solen . . . . .	48
4.	De zuurstofabsorptie van botervet, fosfatiden en fosfatide-fracties. Factoren die hierop invloed uitoefenen . . . . .	52
4.1.	Botervet . . . . .	52
4.2.	Fosfatiden . . . . .	56
4.3.	Fosfatide-fracties . . . . .	62
5.	Veranderingen in het vetzuurpatroon van het vet en van de fosfatiden bij bewaring van boter in het koelhuis . . . . .	65



HOOFDSTUK IV. OXIDATIE VAN HET OPPERVAKTELAAGJE VAN DE VETBOLLETJES	69
1. Inleiding . . . . .	69
2. Isolatie en samenstelling van het oppervlaktelaagje . . . . .	73
3. De zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje. Factoren die hierop invloed uitoefenen . . . . .	76
3.1. Inleiding . . . . .	76
3.2. De invloed van de pH . . . . .	77
3.3. De invloed van koper- en andere ionen . . . . .	85
3.4. De invloed van eiwitten . . . . .	90
3.5. De invloed van de temperatuur . . . . .	98
3.6. De invloed van antioxidanten . . . . .	103
3.6.1. Inleiding . . . . .	103
3.6.2. Eigen onderzoek . . . . .	104
3.7. De invloed van diacetyl en van natriumchloride . . . . .	105
3.7.1. Diacetyl . . . . .	105
3.7.2. Natriumchloride . . . . .	105
HOOFDSTUK V. HET VÓÓRKOMEN VAN KOPER IN MELK, ROOM EN BOTER . . . .	107
1. Inleiding . . . . .	107
2. De bepaling van koper met behulp van natriumdiethyldithiocarbaminaat . . . .	108
2.1. Inleiding . . . . .	108
2.2. Methode . . . . .	108
2.3. Reagentia . . . . .	109
2.4. Standaardcurve voor de bepaling van koper . . . . .	110
2.5. „Recovery”-experimenten en standaardafwijking . . . . .	111
3. Het natuurlijke koper in de melk . . . . .	112
3.1. Het kopergehalte van melk . . . . .	112
3.2. De verdeling van het natuurlijke koper over de melkbestanddelen bij pH 6,5 . . . . .	113
3.2.1. In normale melk . . . . .	113
3.2.2. In nieuwe melk . . . . .	115
4. Het toegevoegde koper in de melk . . . . .	120
4.1. Inleiding . . . . .	120
4.2. De verdeling van het toegevoegde koper over de melkbestanddelen bij pH 6,5. Experimenten met radioactief koper . . . . .	120
5. De binding van koper aan fosfatiden en aan eiwitten . . . . .	122
5.1. Inleiding . . . . .	122
5.2. Wijze waarop de oxidatie van ascorbinezuur onder invloed van koper werd nagegaan . . . . .	123
5.2.1. Manometrisch . . . . .	123
5.2.2. Titrimetrisch . . . . .	128
5.3. De binding van koper aan fosfatiden bij resp. pH 6,8 en pH 4,6 . . . .	130

5.4. De binding van koper aan eiwitten bij resp. pH 6,8 en pH 4,6 . . . . .	131
6. Ionogeen koper in boterserum . . . . .	133
6.1. Manometrisch onderzoek . . . . .	133
6.2. Titrimetrisch onderzoek . . . . .	133
7. De invloed van de pH op de verdeling van het natuurlijke en van het toegevoegde koper in de melk . . . . .	134
7.1. Inleiding . . . . .	134
7.2. Het gedrag van het natuurlijke koper in de melk bij pH-veranderingen	136
7.2.1. Aanzuren en neutraliseren van melk: pH 6,6 → 1,8 → 6,6 . . . . .	136
7.2.2. Aanzuren en neutraliseren van melk: pH 6,6 → 4,6 → 6,6 . . . . .	138
7.2.3. Het natuurlijke koper in de melk bij pH 4,6 . . . . .	140
7.3. Het gedrag van het toegevoegde koper bij pH 4,6. Experimenten met radioactief koper . . . . .	141
8. Het koper in de boter . . . . .	143

## HOOFDSTUK VI. PRAKTISCHE MAATREGELEN TER BESTRIJDING VAN KOELHUIS- GEBREKEN VAN BOTER . . . . .

1. Inleiding . . . . .	146
2. De invloed van bewerkingen van de melk of room op de verdeling van de fosfatiden tussen de vet- en waterfase van de room . . . . .	146
3. Het voorkomen of verminderen van migratie van het toegevoegde koper . . . . .	147
3.1. Het elimineren van koperbesmetting . . . . .	147
3.2. Het verminderen van de migratie van het toegevoegde koper. De invloed van het vetgehalte van de room . . . . .	149
3.2.1. Proeven op laboratoriumschaal . . . . .	150
3.2.2. Proeven op technische schaal . . . . .	151
3.2.3. Het verband tussen het vetgehalte van de room en het kopergehalte van de boter . . . . .	153
3.2.4. De invloed van het vetgehalte van de room op het gehalte aan eiwit van de boter . . . . .	157
Slotbeschouwing . . . . .	160
4. Het doen ontstaan of toevoegen van antioxidanten. . . . .	162
4.1. Vorming van SH-groepen . . . . .	162
4.2. Het toevoegen van antioxidanten . . . . .	163
4.2.1. Inleiding . . . . .	163
4.2.2. Proefseries . . . . .	164
4.2.3. Resultaten . . . . .	165
4.2.3.1. Serie A . . . . .	165
4.2.3.2. Serie B . . . . .	165
4.2.3.3. Serie C . . . . .	167
4.2.3.4. Serie D . . . . .	168
Slotbeschouwing . . . . .	169

5. Het vroegtijdig aantonen van oxidatief bederf . . . . .	170
5.1. Inleiding . . . . .	170
5.2. Het verband tussen de organoleptische beoordeling van koelhuisboter en de TBA-waarde . . . . .	171
 SAMENVATTING . . . . .	 174
 SUMMARY . . . . .	 181
 LITERATUUR . . . . .	 187

## INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

In de weideperiode, als de melkproductie hoog is, slaat men dikwijls grote hoeveelheden boter op in koelhuizen, met het doel deze voorraden in de periode van lage melkproductie af te zetten. Deze voorraden zijn somtijds niet onaanzienlijk, zo waren in febr. '56, juni '58, sept. '60 en in aug. '62 resp. ca. 20 000, 18 000, 18 000 en 25 000 ton boter in de koelhuizen aanwezig. De afzet in het binnenland beweegt zich in langzaam stijgende lijn, doch ligt ver beneden het niveau van de jaarlijkse productie (fig. 1).

Fig. 1. De productie en afzet van boter in de jaren 1952 t/m 1960.

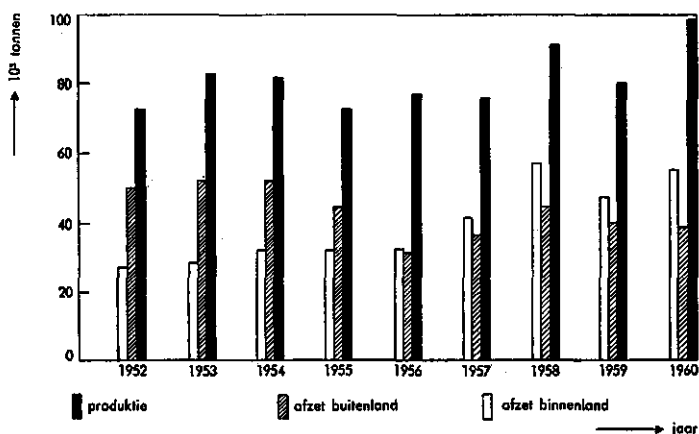


Fig. 1. Production and sale of butter in the years 1952 up to 1960 inclusive.

Bij opslag van boter in het koelhuis bij de voorgeschreven temperatuur van  $-10^{\circ}\text{C}$ , kunnen na verloop van tijd in de boter smaakafwijkingen gaan optreden die worden gekarakteriseerd met de benamingen: vetzig, spekkig en tranig, in deze volgorde tevens aangevend een toenemend organoleptisch onbehagen. Deze gebreken zijn van oxidatieve aard, d.w.z. zijn het gevolg van (chemische) oxidatieve omzettingen in de boter. Gebreken van microbiologische aard zijn, gezien de lage bewaringstemperatuur, van zeer geringe omvang.

Over het algemeen treedt het specifieke koelhuisgebrek pas op na enkele maanden, meestal neemt men gedurende de eerste drie maanden betrekkelijk weinig (oxidatie-) gebreken waar. De intensiteit van de smaakafwijking neemt echter bij langdurige bewaring geleidelijk toe, hetgeen leidt tot een produkt dat voor de consumptie minder

of niet geschikt is. De frequentie waarmee dit gebrek optreedt is niet onaanzienlijk, hetgeen blijkt uit de gegevens van tabel 1.

Tabel 1. De kwaliteit van koelhuisboter, ingeleverd bij het V.I.B., in de jaren 1957 t/m 1961, na bewaring gedurende 4 maanden bij  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Jaar	Gekeurde hoeveelheid kg	Percentage in klasse*		
		E	B	I
1957	13 375 850	79,0	15,6	5,4
1958	4 757 575	86,2	11,3	2,5
1960	11 837 300	92,3	6,6	1,1
1961	21 752 400	85,9	11,9	2,2

\* E = geen  
 B = lichte  
 I = ernstige  
 } smaakgebreken

Table 1. *Keeping quality of cold stored butter, delivered to the V.I.B., in the years 1957 to 1961 inclusive, after storage for 4 months at  $-10^{\circ}\text{C}$ .*

Volgens het Zuivel-Kwaliteitscontrole-Bureau (Z.K.B.) behoorde in 1958 van de bij de 4 maanden oude koelhuisboter waargenomen reuk- en smaakafwijkingen 82,6% tot de groep der oxidatiegebreken. De conclusie uit deze gegevens luidde terecht, dat „verbetering van de duurzaamheid van boter in het koelhuis in de eerste plaats zal kunnen worden verkregen door de oxidatiegebreken zoveel mogelijk te beperken of te voorkomen”.

Een groot aantal fabrieken produceert boter die ook na langdurige bewaring in het koelhuis niet in kwaliteit achteruitgaat. Andere zuivelbedrijven daarentegen hebben regelmatig te kampen met de moeilijkheid houdbare boter te bereiden.

Als belangrijkste oorzaak hiervoor moet worden genoemd de besmetting van melk, room, of boter met koper. MULDER c.s. (1949) hebben er reeds jaren geleden op gewezen, dat besmetting met koper een ongunstige invloed uitoefent op de duurzaamheid van boter. Volgens MENDER (1961) mag worden gesteld dat een radicale verwijdering van alles wat in het bedrijf ook maar de geringste aanleiding zou kunnen geven tot besmetting van boter met koper, ongetwijfeld zal leiden tot een sterk verbeterde duurzaamheid van de boter. Ook KEESTRA (1956) komt, op grond van keuringsresultaten van boter uit de praktijk, tot de conclusie dat, indien de duurzaamheid van koelhuisboter te wensen overlaat, dit bijna altijd moet worden toegeschreven aan een verhoogd kopergehalte van de boter. De maatregelen die in de loop der jaren zijn genomen om de houdbaarheid van koelhuisboter te verbeteren, hadden, volkomen terecht, in eerste instantie betrekking op het opsporen en elimineren van koperbesmetting in het zuivelbedrijf. In hoeverre dit resulteerde in verlaging van het kopergehalte van de boter toont tabel 2. De vervanging van (onvoldoend) vertind koperen materiaal door roestvrij staal heeft ongetwijfeld geleid tot een aanmerkelijke verlaging

Tabel 2. Gemiddeld kopergehalte van de Nederlandse boter in de jaren 1946 t/m 1961.

Jaar	Kopergehalte	Door het Z.K.B. gestelde norm van	
		1/V — 31/X	1/XI — 30/IV
	$\mu\text{g/kg}$		
1946	250	—	—
1947	235	—	—
1948	205	—	—
1949	155	—	—
1950	145	—	—
1951	110	—	—
1952	100	—	—
1953	85	—	—
1954	85	—	—
1955	85	110	150
1956	75	90	130
1957	65	80	120
1958	60	70	100
1959	55	70	100
1960	50	70	100
1961	50	70	100

Table 2. Average copper content of Dutch butter in the years 1946 to 1961 inclusive.

van het kopergehalte van de boter. De vraag kan echter worden gesteld of hiermede de grenswaarde is bereikt. Gezien het feit dat vele bedrijven in staat zijn (goed houdbare) boter te produceren met een kopergehalte van 10–20  $\mu\text{g/kg}$ , moet hierop een ontkennend antwoord worden gegeven.

Een tweede reden is dat Nederlandse boter wordt bereid uit krachtig gezuurde room ( $\text{pH} \pm 4,6$ ). Koelhuisgebreken worden slechts zelden waargenomen in boter die is bereid uit zoete room. Daar zowel de binnen- als buitenlandse consument de uit gezuurde room bereide, hoog aromatische boter prefereert boven zoete boter, is het zuren van de room een technische noodzakelijkheid.

Als derde oorzaak kan worden genoemd de vooruitgang die werd geboekt op bacteriologisch terrein. Verbetering van de microbiologische kwaliteit van boter gaat nl. veelal gepaard met een vermindering van de houdbaarheid in chemisch opzicht. Volgens HIETARANTA (1949) wordt door bacteriële groei de redoxpotentiaal verlaagd, waardoor het milieu minder geschikt wordt voor de ontwikkeling van oxidatieve gebreken. Vandaar dat in sommige landen het toevoegen van gistculturen wordt gepropageerd (MASEK c.s., 1956; KOTOVA, 1959).

Als vierde reden kunnen worden aangemerkt de in de loop der jaren ontwikkelde technische verbeteringen in het bereidingsproces. Hierbij moet speciaal worden gedacht aan de verbeterde kneedtechniek met behulp van moderne (roestvrij stalen) karnen. Ten einde microbiologische invloeden zoveel mogelijk uit te schakelen wordt gestreefd naar een zeer fijne vochtverdeling, waardoor echter de houdbaarheid

in chemisch opzicht vermindert. De betere vochtverdeling resulteert in een sterk vergroot oppervlak van de waterdruppels; op de katalyse van de chemische reacties die in het grensvlak vet/water optreden wordt hierdoor invloed uitgeoefend.

De in het voorgaande genoemde oorzaken zijn min of meer ervaringsfeiten. Over de wetenschappelijke achtergrond is echter nog niet veel bekend, ondanks de grote hoeveelheid literatuur die over dit onderwerp is verschenen. Ongetwijfeld is de kennis over de optredende processen verdiept, desondanks blijkt het nog steeds niet mogelijk de belangrijkste factoren die invloed uitoefenen op de houdbaarheid van boter in het koelhuis (kopergehalte, pH) tot een afgerond geheel te verenigen. Een antwoord op de zeer praktische vraag of men het gedrag van boter in het koelhuis van te voren kan voorspellen, kan nog niet met zekerheid worden gegeven.

Er is echter, gezien de economische importantie, voldoende reden het probleem nogmaals te onderzoeken. Daarbij zal de aandacht voornamelijk moeten worden gericht op de wijze waarop het koper in de boter en de pH van het boterserum invloed uitoefenen op het ontstaan van dit gebrek. Deze twee factoren bepalen immers grotendeels de houdbaarheid van boter in het koelhuis. Zoals reeds is opgemerkt komt het gebrek tranig in zoete boter zelden voor en doet een besmetting met koper de gevoeligheid van boter uit gezuurde room voor het ontstaan van een tranige smaak sterk toenemen. De smaakstoffen die boter tranig doen worden behoren tot de groep van de zg. carbonylverbindingen, die ontstaan door oxidatieve omzettingen in onverzadigde vetzuren. Deze onverzadigde vetzuren zijn gelocaliseerd, zowel in de triglyceriden van het botervet als in de fosfatiden welke zich voor een groot gedeelte in het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes bevinden. Beide fracties kunnen worden beschouwd als potentiële bronnen van de door autoxidatie ontstane reuk- en smaakstoffen.

Het doel van dit onderzoek was de oorzaak van het ontstaan van het koelhuisgebrek op te sporen, een mogelijke samenhang te vinden tussen de hiervoor genoemde factoren en de houdbaarheid, en na te gaan in hoeverre technische maatregelen bij de boterbereiding zouden kunnen bijdragen tot kwaliteitsverbetering van koelhuisboter.

# ENKELE BESCHOUWINGEN OVER DE OXIDATIEGEBREKEN VAN BOTER

### 1. ALGEMEEN OVERZICHT

De reuk- en smaakgebreken die zich tijdens koelhuisopslag van boter ontwikkelen worden algemeen aangeduid als: vettig, spekkig, olieachtig, tranig, (vissig) en talkig. Deze volgorde is er in grote trekken zowel een van chronologische opeenvolging als van toenemend organoleptisch onbehagen. Tranigheid is het typische gebrek van koelhuysboter. De smaak doet denken aan traanolie van walvispek en vertoont veel overeenkomst met die van levertraan. In de Angelsaksische landen noemt men dit gebrek „fishy”, hetgeen niet juist is. De vissige smaak die bij boter kan voorkomen kan misschien het beste worden vergeleken met die van zoute koelhuysaring.

ROGERS (1914) wees er reeds op dat het ontstaan van koelhuisgebreken het gevolg is van oxidatieprocessen die zelfs bij zeer lage temperatuur plaatshebben en die vrijwel uitsluitend optreden indien de pH van de boter voldoende laag is.

De oorspronkelijke verklaring (SUPPLEE, 1919), dat de koelhuisgebreken zouden ontstaan door vorming van trimethylamine of trimethylamineoxide uit lecithine of betaine van veevoederbestanddelen wordt als afgedaan beschouwd. De theorie van DAVIES en MATTICK (1928) vormde de overgang naar een moderner inzicht: trimethylamine of trimethylamineoxide zou onder invloed van koper kunnen worden gevormd door inwerking van vetperoxiden op lecithine. In latere onderzoeken van DAVIES en GILL (1936) wordt geponereerd dat verbindingen van aminen met onverzadigde vetzuren organoleptisch van betekenis zijn. Sindsdien heeft echter langzamerhand de overtuiging veld gewonnen, dat normale autoxidatieprodukten van onverzadigde vetzuren de oorzaak zijn van het ontstaan van koelhuisgebreken.

Algemeen wordt nu in dit opzicht het werk van MOHR en ARBES (1939) en speciaal dat van VAN DER WAARDEN (1944, 1947) van doorslaggevende betekenis geacht. Het gelukte de eerstgenoemde onderzoekers niet om tranig botervet door extractie met zuur volledig van het smaakgebrek te bevrijden. Toevoeging van trimethylamineoxide gaf wél een afwijkende smaak, maar deze was niet vergelijkbaar met het specifieke koelhuisgebrek. Volgens hen zou nóch het botervet, nóch het boterserum bij opslag in het koelhuis tranig worden. De aandacht werd hierdoor wel in het bijzonder gericht op het grensvlak serum/vet als oorzaak van het ontstaan van koelhuisgebreken (MOHR, 1940). VAN DER WAARDEN constateerde dat de tranige, c.q. vissige reuk of smaak zich concentreerde in de vetfase. De smaak was niet uitschudbaar met zuur en een hoogvacuümconcentraat van tranig botervet was praktisch N-vrij. De hoeveelheid N in een concentraat van 1000 g vet van tranige boter (waarbij het vet smaakloos



achterbleef) bedroeg minder dan 8  $\mu$ g. Dit komt overeen met een gehalte aan trimethylamineoxide dat lager is dan 0,04 mg/kg boter. Het concentraat bevatte echter wél carbonylverbindingen. De peroxiden zelf bleken geen smaak of reuk te bezitten.

Inmiddels had GREENBANK (1949) een theorie ontwikkeld, die in de eerste plaats was bestemd voor de verklaring van het ontstaan van oxidatiegebreken in melk; toch werd er veelal een bredere strekking aan toegekend. Volgens hem zou oxidatiesmaak ontstaan door de milde oxidatie van in kleine hoeveelheden aanwezige melkbestanddelen en zou een sterkere oxidatie de gevormde smaakstoffen verder oxideren tot smaakloze verbindingen. VAN DER WAARDEN constateerde bij koelhuisopslag van boter een zoneverschuiving van lage organoleptische waardering van buiten naar binnen en leidde hieruit een hypothese af, die veel weg heeft van die van GREENBANK. De peroxiden die zich bij opslag van boter vormen, oxideren een in beperkte hoeveelheid voorkomend bestanddeel B tot de smaakstof (BO)' en geleidelijk aan verder tot een smaakloze verbinding (BO)''. Uit de peroxiden en stof B worden, aldus VAN DER WAARDEN, smaakstoffen gevormd, terwijl de in het grensvlak uit triglyceriden en/of fosfatiden gevormde peroxiden in het vet diffunderen. Volgens zijn onderzoekingen zou het gebrek tranig dus ontstaan door oxidatieprocessen in het serum of aan de grensvlakken van serum en vet.

Het staat vast dat botervet veel beter houdbaar is dan boter. Waterstofionen, natriumchloride en koper, waarvan wordt aangenomen dat ze het ontstaan van koelhuisgebreken bevorderen, bevinden zich óf in het serum, óf in het grensvlak serum/vet.

Volgens LING (1946) moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid dat de in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes aanwezige fosfatiden verantwoordelijk zijn voor de initiële ontwikkeling van het oxidatieproces. De tranige smaak tengevolge van een zich voortzettende oxidatie zou dan een climax zijn van een systeem van ketteringreacties dat aanvangt bij de fosfatiden.

Uit experimenten van TOLLENAAR (1953) met antioxidanten is gebleken dat in boter met hogere gallaten, geen correlatie bestaat tussen het peroxidegetal van het vet en de organoleptische kwaliteit van de boter. Volgens hem zou de ontwikkeling van het gebrek tranig in koelhuisboter worden veroorzaakt door oxidatieprocessen aan het grensvlak vet/serum, waarbij door oxidatie van triglyceriden en/of fosfatiden carbonylverbindingen worden gevormd die de tranige smaak veroorzaken. In boter zonder deze gallaten treedt een gekoppelde oxidatie op met het botervet, waardoor de ontwikkeling van smaakgebreken en de stijging van het peroxidegetal gelijke tred houden. Wordt nu een in vet oplosbaar antioxidant (bijv. dodecylgallaat) toegevoegd, dan wordt de vetoxidatie geremd, het gebrek tranig ontwikkelt zich echter normaal. Na toevoeging van tetraethylthiuramdisulfide, waardoor o.a. het in het grensvlak vet/serum aanwezige koper wordt verplaatst naar de vetfase, komt de primaire oxidatie niet op gang. De ontwikkeling van het gebrek tranig vindt nu niet plaats. Als gevolg daarvan blijft ook de secundaire oxidatie van het vet achterwege.

MULDER c.s. (1947) bestudeerden het ontstaan van het gebrek metaalsmaak in

boter. Dit gebrek bleek te kunnen worden veroorzaakt door oxidatie van het vet of van de vetachtige verbindingen in de room. Gezien de grote invloed van de zuurheidsgraad van de room en van in water oplosbare antioxidanten (bijv. hydrochinon), lijkt het waarschijnlijk dat het oxidatieproces zich vooral op de grens van de vetfase van de room afspeelt. Uit voortgezette onderzoeken van MULDER en KLEIKAMP (1947), waarin tevens het ontstaan van het gebrek tranig werd bestudeerd, kan de conclusie worden getrokken dat de aanwezigheid van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes essentieel is voor het ontstaan van een tranige smaak.

TOLLENAAR (1953) bereidde boter uit botervet geëmulgeerd in ondermelk en kwam tot de conclusie dat in dergelijke boter, waarin het membraan van de nieuw gevormde vetbolletjes niet meer de oorspronkelijke samenstelling bezit, het gebrek tranig niet optrad.

Uit de gerefereerde onderzoeken blijkt dat de gedachten vooral worden bepaald bij het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes als bron van het gebrek tranig.

## 2. TRIGLYCERIDEN EN/OF FOSFATIDEN ALS OORZAAK VAN HET ONTSTAAN VAN KOELHUISGEBREKEN

De onverzadigde vetzuren in boter, waaruit door oxidatie smaakstoffen (carbonylverbindingen) worden gevormd die aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van het gebrek tranig, zijn gelocaliseerd in het botervet en in de fosfatiden. Zowel de triglyceriden als de fosfatiden kunnen in principe worden beschouwd als potentiële bron voor het ontstaan van koelhuisgebreken. In het onderstaande is hieraan nader aandacht besteed.

### 2.1. Tryglyceriden

Van de totale hoeveelheid vet in de melk komt ca. 99% voor in de vorm van triglyceriden, die als vetbolletjes zijn gedispergeerd in het melkplasma. Boter bestaat voor minstens 80% uit botervet (triglyceriden), de vetfasen in boter nemen dus procentueel de belangrijkste plaats in. Het aantal combinaties met glycerol dat men zich van de vetzuren kan denken is zeer groot. Waarschijnlijk komen er zo goed als geen enkelvoudige vetten met drie gelijke vetzuurresten in het melkvet voor. Men neemt aan dat de verschillende vetzuren in het melkvet tamelijk gelijkmatig over de triglyceriden zijn verdeeld.

De vetzuren in melkvet zijn niet altijd in dezelfde verhouding aanwezig. Dit blijkt o.m. uit de schommelingen die verschillende kengetallen ondergaan (bijv. RMW, Polenske en joodadditiegetal). Behalve verzadigde vetzuren komen in het melkvet ook variërende hoeveelheden onverzadigde vetzuren voor. Zo heeft zomer-(weide-) boter een meer onverzadigd karakter dan winter-(stal-) boter.

STADHOUDERS en MULDER (1955, 1956) bestudeerden uitvoerig de samenstelling van de onverzadigde vetzuren van botervet. In tabel 3 is de door hen gevonden molaire samenstelling van deze vetzuren samengevat.

Tabel 3. Molaire samenstelling van de vetzuren van botervet (joodgetal van het vet: 32,1-46,6).

Vetzuren	%
Verzadigd	57,6-81,8
Monoeen	23,7-36,3
Geconjugueerd (vnl. dieen)	0,53-2,49
Dieen	0,64-1,46
Trieen	} niet geconjugueerd
Tetraeen	
	0,35-0,71
	0,24-0,52

Table 3. *Molar composition of the fatty acids of butter fat (iodine addition number of the fat: 32,1-46,6).*

Uit hun onderzoekingen is komen vast te staan dat botervet in de zomer veel meer geconjugueerde, tweevoudig onverzadigde vetzuren bevat dan in de winter en dat het omgekeerde geldt voor de hoeveelheid niet-geconjugueerde, tweevoudig onverzadigde vetzuren. De hoeveelheid drievoudig onverzadigde vetzuren vertoont vóór en na isomerisatie een klein verschil tussen zomer- en winterwaarden. In de winter is het gehalte lager dan in de zomer. Van de viervoudig onverzadigde vetzuren viel omtrent een verschil tussen zomer- en winterwaarden weinig met zekerheid te zeggen.

Vanzelfsprekend heeft men getracht verband te leggen tussen het gehalte aan onverzadigde vetzuren van het botervet en de gevoeligheid van boter voor oxidatie. STEBNITZ en SOMMER (1957) constateerden dat er een groot verschil in gevoeligheid voor oxidatie bestond tussen verschillende botervetten. Vet van zomerboter zou gevoeliger zijn dan dat van winterboter. Er zou een lineair verband bestaan tussen het gehalte aan linolzuur en de stabiliteit van het vet.

GUNSTONE en HILDITCH (1945) wijzen op de snelheid waarmee linol- en linoleenzuur oxideren. De gevormde hydroperoxiden zouden de oxidatie van oliezuur katalyseren. Volgens HOLMAN en ELMER (1917) zou de snelheid waarmee onverzadigde vetzuren oxideren verdubbelen voor elke extra dubbele binding. Het is echter zeer de vraag of zij wel met zuivere vetzuuresters hebben gewerkt. BADINGS (1960) vond dat de snelheden waarmee methylesters van olie-, linol-, linoleen- en arachidonzuur bij 37°C oxideren, zich verhouden als 1 : 150 : 360 : 530.

HOLM en WODE (1953) stellen dat de gevoeligheid van botervet voor oxidatie afhankelijk is van het gehalte aan dieen- en trieenzuren, waarop o.m. invloed wordt uitgeoefend door het jaargetijde. Volgens MATSSON c.s. (1951a) is in botervet het gehalte aan geconjugueerd C<sub>18</sub> vetzuur (dieen of trieen) en linoleenzuur in de zomer en vroege herfst hoger dan in de winter en in het voorjaar. Het gehalte aan linolzuur zou niet variëren, hetgeen echter niet in overeenstemming is met de resultaten van

STADHOUDERS en MULDER (1955, 1956). De hoeveelheden dieën- en trieenzuren bleken afhankelijk van de voeding (MATSSON, 1949, 1951b).

Het oxidatieproces in boter is in werkelijkheid echter zó gecompliceerd, dat men niet zonder meer vergelijkingen mag treffen tussen hetgeen in botervet gebeurt en dat wat zich in een zo complex geheel als boter afspeelt. Dit blijkt o.m. uit het feit dat het autoxidatieproces in boter sterk afhankelijk is van de pH: bij verlaging van de pH verloopt de oxidatie sneller, voor de vetzuuresters is juist het omgekeerde het geval (SWARTLING en MATSSON, 1956). Verder kan op de inductieperiode invloed worden uitgeoefend door toevoeging van in water oplosbare antioxidanten, waaruit volgt dat de snelheid waarmee boter autoxideert invloed ondervindt van de waterfase.

## 2.2. Fosfatiden

Behalve triglyceriden komen in melk andere vetachtige stoffen voor, o.a. fosfatiden (ca. 0,04%, ca. 1% van de totale hoeveelheid vet in de melk), die, geassocieerd met eiwitten, zich voor ca. 60% bevinden in het grensvlak vet/water van de vetbolletjes. Deze kleine hoeveelheid fosfatiden in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes is voldoende om een mono-moleculaire laag om de bolletjes te vormen.

Room die wordt verkregen door melk te centrifugeren, is betrekkelijk rijk aan fosfatiden. Bij een vetgehalte van de room van 25%, komt ca. 90% van deze fosfatiden voor in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Indien room wordt gekarnd, gaat een gedeelte van het fosfatide-eiwitcomplex uit het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes over in de karnemelk. Desondanks bevat boter nog een aanzienlijke hoeveelheid fosfatiden (ca. 0,2%) die vrijwel allemaal afkomstig zijn van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes.

Wat betreft de vetzuursamenstelling van de fosfatiden kan worden opgemerkt dat hiervoor hetzelfde geldt als voor het melkvet. Zowel de verhouding verzadigd-onverzadigd als de vetzuursamenstelling binnen deze twee groepen varieert. Het gehalte aan onverzadigde vetzuren is echter veel hoger dan dat van het melkvet, hetgeen blijkt uit het feit dat het joodgetal van de fosfatiden ca. 14 eenheden hoger ligt dan dat van het melkvet. Het patroon van de onverzadigde vetzuren van de fosfatiden zal nader worden besproken in hoofdstuk II.

Omtrent het structurele verband tussen de fosfatiden en de overige boterbestanddelen tasten wij nog grotendeels in het duister. Wij komen hierop nader terug in hoofdstuk IV.

In boter is de structuur van het oppervlaktelaagje niet meer dezelfde als die van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes in melk. Er zullen ongetwijfeld vetbolletjes van de melk zonder meer in de boter overgaan, anderzijds zal de „binding” tussen vetmembraan en vetoppervlak echter sterk hebben geleden door de verschillende bewerkingen. Ook is door de uitpersing en samenvloeiing van vrij vet en door de vereniging en verdeling van vetbolletjes de directe samenhang tussen het membraan en

het vet deels verloren gegaan. De nieuw gevormde vetbolletjes zullen wellicht gedeeltelijk een ander oppervlaktelaagje hebben dan de oorspronkelijke melkvetbolletjes, want een eenmaal van het oppervlak losgemaakt membraan of een deel hiervan zal zich daaraan niet meer spontaan hechten.

Resumerend kan worden gesteld dat, hoewel wij over de „macrostructuur” behoorlijk zijn ingelicht (MULDER, 1947), van de „microstructuur” (de onderlinge rangschikking en bindingen) nog weinig bekend is.

### 2.3. Fosfatiden-triglyceriden als potentiële bron voor het ontstaan van koelhuisgebreken

Wat betreft de verbindingen die de koelhuisgebreken veroorzaken concentreren de meningen zich voornamelijk op de fosfatiden (PONT, 1960). LEA (1953a, 1953b) gaf een summier overzicht van argumenten ten gunste van deze opvatting: in melk met een oxidatiesmaak is het joodgetal van de fosfatiden gedaald, zulks in tegenstelling met dat van het botervet (SWANSON en SOMMER, 1940), terwijl tevens de inductieperiode van het vet nog niet is beëindigd (HENDERSON en ROADHOUSE, 1934); in „synthetische” boter ontstaat alleen het gebrek tranig indien het oppervlaktelaagje is geïncorporeerd (VAN DER WAARDEN, 1948; VAN HAEFTEN en PETTE, 1953b); oxidatie van fosfatiden geeft aanleiding tot de typische oxidatiesmaak van melk (JOSEPHSON en DOAN, 1939) en het gehalte aan polyeenzuren in fosfatiden is zeer hoog (HILDITCH, 1947).

PONT (1953a) stelde vast dat een zeer lichte graad van oxidatie van het melkvet bijdraagt tot de oxidatiesmaak in melk. Uit onderzoekingen van FORSS c.s. (1955) is gebleken dat de kartonsmaak van ondermelk of van volle melk voornamelijk wordt veroorzaakt door  $C_7$ - $C_9$  aldehyden (2-onverzadigd en 2-4 di-onverzadigd), in concentraties van 1 deel in  $10^7$ - $10^9$  delen melk. Deze verbindingen zijn typische autoxidatieprodukten van onverzadigde vetzuren (LEA, 1953) en kunnen dus zeer goed afkomstig zijn van de fosfatiden in ondermelk. Zelfs van een bestanddeel van ondermelk dat in een zeer geringe concentratie voorkomt, zoals het geval is met de fosfatiden, kan in principe worden verwacht dat het invloed heeft op de smaak indien de ontledingsprodukten reeds in uiterst geringe concentratie organoleptisch zijn aan te tonen.

### 3. OXIDATIEPRODUKTEN VAN ONVERZADIGDE VETZUREN DIE REUK- EN SMAAKAFWIJKINGEN VEROORZAKEN

VAN DUIN (1960) dispergeerde melkfosfatiden in een buffer (pH 4,6) waaraan sporen koper waren toegevoegd en volgde de oxidatie. Na verloop van tijd ontstond een vette smaak, die vervolgens olieachtig-tranig en tenslotte talkig werd. De vluchtige reuk- en smaakstoffen werden in vacuüm afgedestilleerd en de carbonylverbindingen werden omgezet in de overeenkomstige 2-4 dinitrofenylhydrazonen, die met behulp

van verdelings- en adsorptiechromatografie werden gescheiden. Vervolgens werden de oorspronkelijke verbindingen vrijgemaakt uit de derivaten en organoleptisch beoordeeld. Aanwezig waren de volgende carbonylverbindingen:

1. methylketonen met 3, 4 en 5 C-atomen. Deze zijn deels als artefacten te beschouwen, ze leverden geen wezenlijke bijdrage tot de oxidatieve smaakafwijkingen;

2. verzadigde aldehyden;

a.  $C_{14}$ – $C_{18}$  aldehyden, ontstaan door hydrolyse van acetaalfosfatiden (VAN DUIN, 1958), niet bijdragend tot reuk en smaak.

b.  $C_2$ – $C_{13}$  aldehyden, waarvan de  $C_3$  en  $C_5$ – $C_{10}$  aldehyden aanleiding gaven tot een zepige, „groene”, nootachtige en talkige smaak.

3.  $\alpha$  –  $\beta$  onverzadigde aldehyden, voornamelijk  $C_5$ – $C_{11}$  aldehyden: verfachtig, talkig;

4.  $\alpha$  –  $\beta$ ,  $\gamma$  –  $\delta$  tweevoudig onverzadigde aldehyden, voornamelijk  $C_6$ – $C_{10}$  aldehyden: vetzig, zalvig;

5. onverzadigde aldehyden met één dubbele binding, maar op een andere dan de  $\alpha$  –  $\beta$  plaats.  $C_8$ – $C_{10}$  aldehyden: karton, stopverf, tranig;

6. tweevoudig onverzadigde aldehyden met één dubbele binding op de  $\alpha$  –  $\beta$  plaats en één op een andere dan de  $\gamma$  –  $\delta$  plaats,  $C_8$ – $C_9$  aldehyden.

Deze verbindingen (groepen 5 en 6) waren in uiterst geringe hoeveelheden aanwezig, doch hadden een zeer intensieve reuk en smaak. In verdunde toestand werden ze organoleptisch gekwalificeerd als tranig-vissig. Volgens VAN DUIN wordt nu het gebrek tranig in belangrijke mate veroorzaakt door de verbindingen uit de groepen 5 en 6.

PONT c.s. (1960) constateerden dat indien aan botervet koper, nordihydroguajareetzuur en citroenzuur opgelost in propyleenglycol werden toegevoegd, het vet na bewaring gedurende 3–4 maanden bij kamertemperatuur, vissig werd (fish-oil flavour). Het feit dat de zuurheidsgraad van het vet bij het ontstaan van het gebrek van groot belang is, gaf aanleiding tot de hypothese dat het ontstaan van het gebrek tranig in boter uit gezuurde room zou kunnen worden bepaald door in het vet aanwezige verbindingen. Het door hen gebruikte botervet bevatte echter 0,025% fosfatiden, die wellicht ook als oorzaak voor het ontstaan van het gebrek zouden kunnen worden aangemerkt.

FORSS c.s. (1960a) isoleerden de carbonylverbindingen uit het aldus verkregen vissige botervet en stelden voornamelijk n-hexanal, n-heptanal en in mindere mate het hex-2-enal verantwoordelijk voor de vissige smaak van botervet. De begeleidende metaalsmaak werd veroorzaakt door oct-1-en-3-one. Deze verbinding was organoleptisch aan te tonen in een verdunning van 1 :  $10^{10}$  (STARK en FORSS, 1962). De fish-oil flavour van gewassen room waaraan koper en ascorbinezuur waren toegevoegd, werd door hen eveneens toegeschreven aan genoemde carbonylverbindingen (FORSS c.s., 1960b). Deze resultaten zijn echter niet in overeenstemming met die van VAN DUIN; de door FORSS c.s. geïsoleerde verbindingen horen thuis in de groepen 2b en 3, die geen van beide aanleiding geven tot de typische tranige-vissige smaak.

In hoeverre door hen „verborgen” dubbele bindingen over het hoofd zijn gezien, is niet bekend. Rekening moet worden gehouden met de mogelijkheid dat carbonylverbindingen, behorend tot de groepen 5 en 6 (VAN DUIN) inderdaad van belang zijn voor de smaakafwijkingen, hetgeen wordt geïllustreerd door het onderzoek van HOFFMANN (1961). De zg. „green reversion flavour” van soyabonen-olie bleek te worden veroorzaakt door cis-3-hexenal.

De door FORSS c.s. (1960c) uit talkig, verfachtig botervet geïsoleerde carbonylverbindingen bleken te behoren tot de groepen 2 en 3. De talkige smaak werd veroorzaakt door n-octanal en n-nonanal, de verfachtige smaak door n-pentanal en pent-2-enal. Deze reactieproducten passen dus wel in het schema van VAN DUIN.

HOLM c.s. (1952) stelden vast, dat er een direct verband bestaat tussen de hoeveelheid  $\alpha - \beta$  onverzadigde carbonylverbindingen en de tranige smaak van boter. In het licht van het onderzoek van VAN DUIN is men geneigd te veronderstellen dat deze carbonylverbindingen fungeren als „verklikker” voor een tranige smaak, zonder er zelf direct bij betrokken te zijn.

BADINGS (1959) constateerde dat bij de autoxidatie van linolzuur in hoofdzaak hexanal, octen-2-al en decadien-2,4-al ontstaan, die resp. thuishoren in de groepen 2, 3 en 4. Deze verbindingen kunnen dus niet verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van het gebrek tranig. Indien wij het aan de vorming van deze verbindingen ten grondslag liggende reactieschema (BADINGS, 1960) toepassen op de hogere onverzadigde vetzuren, zoals linoleenzuur en arachidonzuur, zullen behalve verbindingen uit de groepen 2, 3 en 4, aldehyden uit de groepen 5 en 6 worden gevormd, die mogelijk wel aanleiding zouden kunnen geven tot het optreden van het gebrek tranig. Zo zullen bij de autoxidatie van linoleenzuur o.a. hexen-3-al (groep 5) en octadien-2-5-al (groep 6) kunnen worden verwacht. In overeenstemming hiermede stelde BADINGS vast, dat methyllinolenaat na autoxidatie een tranige-vissige reuk had. Als autoxidatieproduct van methylarachidonaat kan o.a. het tot groep 5 behorende nonen-3-al worden verwacht. De oxidatieproducten van deze vetzuurester hadden echter geen tranige smaak. Bij autoxidatie van oliezuur zal men aldehyden uit de groepen 2 en 3 kunnen verwachten, die het gebrek talkig veroorzaken. In hoeverre echter dieen-, trieen- en tetraeenzuren andere dan linol-, linoleen- en arachidonzuur bijdragen tot het ontstaan van koelhuisgebreken is niet bekend. Dit geldt ook voor de pentaeenfractie (zie hoofdst. II), die ongetwijfeld sneller zal oxideren dan de lagere onverzadigde vetzuren.

In de aanvangsperiode van de autoxidatie zullen nu voornamelijk de hoog onverzadigde vetzuren worden geoxideerd, waardoor gebreken als vettig en tranig ontstaan. Het oxidatiepatroon vertoont echter een dynamisch karakter, hetgeen impliceert dat de aard van het gebrek verandert: bij langdurige bewaring worden ook de minder onverzadigde vetzuren geoxideerd, waardoor het gebrek talkig tenslotte gaat overheersen.

#### 4. FACTOREN DIE INVLOED UITOEFENEN OP HET ONTSTAAN VAN KOELHUISGEBREKEN

##### 4.1. Inleiding

Het vraagstuk betreffende de factoren die invloed uitoefenen op de houdbaarheid van koelhuisboter is uitermate gecompliceerd, hetgeen wel hieruit blijkt dat o.m. de volgende factoren in het onderzoek werden betrokken: redoxpotentiaal en pH van het boterserum, koper, ijzer en mangaan, lucht, fosfatiden, onverzadigde vetzuren van het botervet, pro- en antioxidanten, enzymen, pasteurisatietemperatuur van de room, type van de karn, de bewerking van de boter, invloed van het licht, toevoeging van zout, wassen van de boterkorrels, de bewaar­temperatuur en het seizoen.

##### 4.2. Redoxpotentiaal (Eh) en pH

HIETARANTA (1949) stelde een onderzoek in naar het verloop van de Eh tijdens het rijpen van room. Indien de pH daalde van 6,5 tot 4,5 verminderde de Eh van 250 tot —175 mV. Nu zegt de Eh die tijdens het rijpen van room wordt bereikt niets omtrent de Eh van boter, daar er tijdens en na het karnen aanzienlijke veranderingen optreden. De Eh in boter zou volgens hem afhankelijk zijn van microbiologische activiteit en groei en veel minder worden bepaald door chemische processen.

SAAL en HEUKELOM (1946, 1947a, 1947b) onderzochten de Eh van boterplasma. Tijdens de vorming van de boterkorrels verandert de verhouding tussen de hoeveelheid antioxidanten enerzijds en de hoeveelheid oxidabele stoffen anderzijds. Zij maten de Eh van boterplasma en constateerden dat, gezien de hoge Eh-waarde ( $\pm 300$  mV), oxidatieprodukten aanwezig zijn met een hoge normaal­potentiaal. Daarentegen komen deze produkten in karnemelk niet voor. Blijkbaar overheerst in dit produkt de reducerende werking van micro-organismen. Kort na de bereiding van boter is in het plasma het ascorbinezuur verdwenen en zijn hierin betrekkelijk grote hoeveelheden oxiderende bestanddelen gevormd. De potentiaal is daardoor hoog en is weinig afhankelijk van de concentratie van deze bestanddelen. Potentiaalveranderingen van boterplasma zouden daarom volgens de auteurs geen indicatie geven omtrent een eventuele ontwikkeling van smaakafwijkingen. Op grond van hun redoxpotentiaal­metingen kwamen zij tot de conclusie dat zuurstof in het boterserum zeer snel stoffen vormt met een hoge redoxpotentiaal, waarna tijdens opslag de hoeveelheid peroxiden toeneemt ten koste van deze plasmastoffen.

Uit proeven van MULDER en KLEIKAMP (1947) is gebleken dat de zuurheidsgraad van de room van grote invloed is op de in dit produkt optredende oxidatiegebreken. Door de room tot een lage pH-waarde aan te zuren, kon het gebrek tranig binnen 24 h worden opgewekt. VAN HAEFTEN en PETTE (1953b) zijn echter van oordeel dat de smaaknuances afweken van die van koelhuisboter. De smaakafwijking trad niet



op in gezuurde gewassen room. Hierop komen wij in hoofdstuk IV nader terug.

MASEK c.s. (1956) stelden eveneens vast dat de zuurheidsgraad van de room van grote invloed is op de houdbaarheid van de boter. Een beter houdbare boter werd verkregen door de room niet volledig te laten rijpen ( $< 18^{\circ}\text{SH}$ ). PIRAUX c.s. (1956b) constateerden dat boter met een pH van  $\geq 4,8-5,0$  beter houdbaar was dan boter met een pH  $\leq 4,5$ .

De wijze waarop de pH invloed uitoefent op de gevoeligheid van room en boter voor het ontstaan van oxidatiegebreken is echter nog niet duidelijk. VIRTANEN (1945) neemt aan dat de snelheid waarmee lecithine wordt geoxideerd gering is tussen pH 6,0 en 7,0 en toeneemt bij verlaging van de pH. Om de houdbaarheid van boter uit gezuurde room te verbeteren, wordt in Finland het naar VIRTANEN genoemde AIV-zout gebruikt, bestaande uit 90 dln NaCl, 5 dln  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 5 dln (watervrij)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Men bereikt hiermee dat de pH van het serum wordt teruggebracht tot een waarde van 6,0-7,0, waardoor de redoxpotentiaal zou worden verlaagd. De oxidatieprocessen worden nu onderdrukt, terwijl de bacteriële activiteit sterk wordt verhoogd. Dit gaat gepaard met een verdere verlaging van de redoxpotentiaal.

#### 4.3. Metalen

MULDER c.s. (1949) stelden een onderzoek in naar de invloed van koper, ijzer en mangaan op de smaak en de houdbaarheid van boter. Indien ijzer- en/of mangaanzouten aan de room werden toegevoegd, kon in de boter nimmer een koelhuisgebrek worden waargenomen; ijzer en mangaan (afzonderlijk of gecombineerd) hebben dus geen invloed op het ontstaan van deze gebreken. Wél geven ze een bepaalde smaak aan de boter, nl. die van de metaaloplossing zelf. IJzer geeft aanleiding tot een metaalachtige, wrange smaak, mangaan tot een zoetige smaak. Tevens bleek dat na toevoeging van ijzer- en/of mangaanzouten de invloed van toegevoegd koper niet werd versterkt. De resultaten van deze experimenten werden bevestigd door MENDER en MULDER (1957).

Wat betreft de invloed van koper werd door hen waargenomen dat toevoeging van een zeer geringe hoeveelheid aan de room, waardoor het kopergehalte van de uit deze room bereide boter met ca.  $50 \mu\text{g/kg}$  werd verhoogd, voldoende was om na 3 maanden het specifieke koelhuisgebrek te doen ontstaan. Tevens bleek dat, uitgaande van normale melk, geen koelhuisgebreken optraden indien de melk niet met koper was besmet. Uit deze waarnemingen werd de conclusie getrokken dat het van nature in de melk aanwezige koper geen schadelijke invloed uitoefent, het toegevoegde koper wél. In hoofdstuk V zal hierop nader worden teruggekomen.

Volgens PIRAUX c.s. (1956a) moet als „kopergrens” voor houdbare koelhuisboter een waarde van  $50 \mu\text{g}$  koper/kg worden gesteld. In het gebied van  $50-70 \mu\text{g}$  koper/kg kwamen nog veelvuldig koelhuisgebreken voor. Tot dezelfde resultaten kwamen te-

voren KRUISHEER en KROL (1955). Het verband tussen kopergehalte en houdbaarheid bleek echter voor winterboter minder duidelijk: 's winters komen aanzienlijk hogere kopergehalten voor, zonder dat hierdoor invloed werd uitgeoefend op de houdbaarheid. Boter met een kopergehalte van 100–180  $\mu\text{g/kg}$  vertoonde na bewaring vaak geen koelhuisgebreken. Merkwaardig was echter, dat praktisch al deze boters afkomstig waren uit één bepaalde streek. In hoeverre de voeding en/of grondsoort hierbij van belang zijn is niet duidelijk. KIERMEIER en STEGER (1961) stelden vast dat het kopergehalte van de melk o.m. afhankelijk is van de grondsoort.

Op welke wijze is nu het koper in de boter gebonden? Uit zorgvuldig verrichte onderzoeken van MENDER en MULDER (1957) is komen vast te staan dat het vet geen koper bevat. In melk zou 75–90% van het natuurlijke koper zijn gebonden aan plasmabestanddelen (voornamelijk eiwitten) en 25–10% zou voorkomen in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Een zeer kleine hoeveelheid ( $\leq 10\%$ ) zou in een al of niet complexe vorm aanwezig zijn in het melkserum. Het toegevoegde koper werd voor een zeer groot gedeelte gebonden aan de plasmaeiwitten. De hoeveelheid koper die door het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes werd opgenomen nam eveneens toe, echter niet evenredig met de toeneming van het kopergehalte van het melkplasma. Wat betreft het melkserum kan worden opgemerkt, dat hierin van het toegevoegde koper relatief minder aanwezig was dan van het natuurlijke koper.

Indien wij het gemiddelde kopergehalte van melk op 40  $\mu\text{g/kg}$  stellen zal in het plasma ca. 32  $\mu\text{g}$  koper voorkomen, d.i. bij een eiwitgehalte van de melk van 3,2% ongeveer 1  $\mu\text{g/g}$  plasmaeiwit. Aangezien boter slechts ca. 6 g eiwit/kg bevat (inclusief het eiwit van het oppervlaktelaagje), is het duidelijk dat bij een natuurlijk kopergehalte van  $\pm 50 \mu\text{g/kg}$  (MULDER c.s., 1949), het grootste gedeelte van het koper in de boter moet zijn gebonden aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Tot deze conclusie kwam ook DAVIES (1933).

VAN DER WAARDEN (1947) ging de invloed van de pH op de koperbinding in boter na. Volgens hem zouden bij verlaging van de pH van het boterplasma de fosfatiden méér koper binden, de eiwitten minder en een klein gedeelte van het koper, in een niet aan eiwitten gebonden vorm, zou in de waterfase voorkomen. Toegevoegd koper zou op dezelfde wijze en in dezelfde verhouding aan de verschillende fracties zijn gebonden. Er zou dus geen verschil in binding bestaan tussen natuurlijk en toegevoegd koper. ALLAN (1950) komt echter tot een tegengestelde conclusie op grond van kinetische metingen die hij verrichtte aan de snelheid waarmee ascorbinezuur in boterserum oxideert.

De grote activiteit van koper bij lage pH wordt door VAN DER WAARDEN (1947) verklaard uit de wijze waarop het koper bij deze pH is gebonden: de hoeveelheid koper die is gebonden aan de fosfatiden zou bij deze pH juist maximaal zijn. Daar volgens VIRTANEN (1945) de oxidatie van lecithine wordt versneld door de pH te verlagen, zou de verhoogde koperbinding hierop superponeren.

Volgens THOMÉ (1953) zijn in boter verschillende systemen aanwezig die voor veranderingen van de pH gevoelig zijn, waardoor oxidatie zou worden bevorderd. Een

van deze systemen is complex gebonden koper bij pH 6,8, ionogeen koper bij pH 4,6. Koperionen zouden een grotere invloed hebben op de oxidatieprocessen dan gebonden koper. Voor deze veronderstelling zijn echter geen bewijsgronden aan te voeren. Bovendien is het niet waarschijnlijk dat in boter vrije koperionen voorkomen (MENDER 1961). Een ander systeem zou lecithine zijn, waarvan de oxidatie, zoals reeds is vermeld, pH-gevoelig is.

LONCIN en JACQMAIN (1959) huldigen een theorie waarin wordt gesteld dat alleen niet-complex gebonden, in de vetfase aanwezig koper als pro-oxidant fungeert in gemulgeerde vetten. Toevoeging van aminozuren (o.a. glyocol, alanine) zou het koper uit de vetfase doen overgaan in de waterfase, door binding aan deze aminozuren. Deze theorie is echter niet steekhoudend, daar het vet geen koper bevat (MENDER, 1961). Bovendien is niet bewezen dat aminozuren koperionen sterker binden dan plasmaeiwitten.

Volgens MOHR en KOENEN (1958) kan koper in boter op tweeërlei wijze de oxidatie van de onverzadigde vetzuren bevorderen: bij afwezigheid van vrije vetzuren door oxidatie van de onverzadigde vetzuren van de fosfatiden en bij aanwezigheid van deze vrije vetzuren door het daaraan gebonden koper dat naar de vetfase migreert. Deze theorie is echter, evenals de hiervoor genoemde, uiterst speculatief en mist elk reëel bewijs.

Resumerend kan worden gesteld dat, gezien de verschillende hypothesen betreffende de aard van de koperbinding, over de wijze waarop koper als pro-oxidant werkzaam is nog zó weinig bekend is, dat nader onderzoek in dezen dringend is gewenst.

#### 4.4. Pro- en antioxidanten

##### 4.4.1. Caroteen en vitamine A

Zowel het caroteen- als het vit. A-gehalte van het onverzeepbare gedeelte van het botervet is het hoogst in de weideperiode en het laagst in de stalperiode. KRUISHEER en DEN HERDER (1952) vonden per gram boter resp. 7,1-10,2  $\mu\text{g}$  vit. A (gem. 9,0  $\mu\text{g}$ ) en 2,8-6,4  $\mu\text{g}$  caroteen (gem. 5,0  $\mu\text{g}$ ). Verschillende onderzoekers gingen de invloed van caroteen en vit. A op de autoxidatie van botervet na. Zo vonden o.a. THOMPSON en STEENBOCK (1944) dat, indien de van nature aanwezige antioxidanten uit het vet werden verwijderd, de inductieperiode na toevoeging van  $\beta$ -caroteen werd verkort en de oxidatie versneld. Volgens CHEVALLIER c.s. (1949) fungeert caroteen als antioxidant indien het vet in het donker wordt bewaard, daarentegen als pro-oxidant, indien het vet in het licht wordt bewaard.

Uit een statistisch onderzoek van KRUISHEER en KROL (1955) aan een groot aantal monsters boter, is komen vast te staan dat er geen verband bestaat tussen het caroteen-en/of vit. A-gehalte van boter uit gezuurde room en de houdbaarheid.

#### 4.4.2. Vitamine E

KRUKOVSKY c.s. (1949, 1950, 1952) stelden vast dat er een significante correlatie bestaat tussen het vit. E-gehalte van melk en de resistentie tegen het ontstaan van oxidatiesmaak. KRUISHEER (1955) merkte echter terecht op dat het aantonen van een dergelijke correlatie geen strikt bewijs is voor een causaal verband. Zo namen SMITH c.s. (1952) waar dat na toevoeging van vit. E aan room de houdbaarheid van dit produkt in het koelhuis niet werd verbeterd. SWARTLING (1949) constateerde dat vit. E, toegevoegd aan boter tijdens het kneden, een pro-oxiderende invloed had.

KRUISHEER (1955) bepaalde het vit. E-gehalte van een groot aantal partijtjes boter. Het gehalte bedroeg 8–34  $\mu\text{g}$  vit. E/g boter (gem. 20  $\mu\text{g}$ ). Gevonden werd, dat het vit. E-gehalte (evenals het gehalte aan caroteen en vit. A) sterke seizoenvariatiën vertoont. Bij de overgang van stal naar weide heeft een snelle stijging plaats, het gehalte aan de in vet oplosbare vitaminen daalt snel in het najaar, een daling die zich in de wintermaanden voortzet. Uit het reeds gerefereerde onderzoek van KRUISHEER en KROL (1955) is gebleken, dat er geen correlatie bestaat tussen het vit. E-gehalte van boter uit gezuurde room en de houdbaarheid.

#### 4.4.3. Vitamine C

In melk is vit. C via het redoxsysteem ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur van groot belang in de reacties die leiden tot het ontstaan van smaakgebreken. In boter wordt vit. C echter zeer snel geoxideerd, zodat hiervan weinig invloed is te verwachten.

TOLLENAAR (1953) voegde vit. C toe aan boter (via de room) en vond na bewaring van de boter bij  $-8^{\circ}\text{C}$  dat de houdbaarheid, beoordeeld naar het peroxidegetal, was verbeterd; in organoleptische zin was van een verbeterde houdbaarheid echter geen sprake. Werd vit. C toegevoegd aan de boterkorrels dan trad na verloop van tijd een bruine verkleuring op. De daarmee gepaard gaande smaakafwijking werd aangeduid als goor, metalig. HARTMANN (1951) en SABALITSCHKA (1953) kwamen tot dezelfde conclusies als TOLLENAAR.

#### 4.4.4. Diacetyl

Volgens BARNICOAT (1935, 1937) zou diacetyl geen invloed hebben op de houdbaarheid van botervet, hetgeen werd bevestigd door WILEY (1939).

REINART (1949) kent echter aan diacetyl een pro-oxiderende invloed toe, daar deze verbinding gemakkelijk kan worden gereduceerd. In concentraties  $>0,01\%$  zou diacetyl in botervet een pro-oxiderende invloed uitoefenen (RITTER en NUSSBAUMER, 1939). PETTE (1949) vergeleek 19 hoogaromatische boters (1,35 mg diacetyl/kg) met 18 min of meer neutrale boters (0,22 mg/kg), allen met hetzelfde kopergehalte. Er kon geen

correlatie worden vastgesteld tussen het diacetylgehalte van de boter en de houdbaarheid.

#### 4.4.5. *Vetperoxiden, vrije vetzuren en vocht*

Wat betreft de invloed van vetperoxiden, vrije vetzuren en vocht in botervet kan worden volstaan met te vermelden, dat de invloed hiervan op de houdbaarheid van botervet door verschillende onderzoekers is nagegaan. Meermalen werd geconstateerd dat genoemde factoren een ongunstige invloed uitoefenen op de stabiliteit van het vet. Uit deze experimenten kunnen echter geen bewijsgronden worden aangevoerd omtrent een eventuele invloed op de stabiliteit van boter zelf.

#### 4.5. Invloed van een enzym

Uit onderzoekingen van WILEY (1939) is gebleken dat boter, bereid uit met zuursel gezuurde room (pH 5), minder houdbaar was dan boter uit met melkzuur gezuurde room (pH 5). Hieruit concludeerde hij dat in boter een uit het zuursel afkomstig vet-oxiderend enzym aanwezig zou zijn. De optimale activiteit van dit enzym zou bij pH 5,0 liggen. Zijn conclusie is echter niet zonder meer juist. Zeer waarschijnlijk was de pH van de boter die was bereid uit de met zuursel gezuurde room gedaald tot een waarde van 4,5–4,6.

TOLLENAAR (1953) stelt de hypothese, voortvloeiend uit zijn experimenten met tetraalkylthiuramdisulfiden, dat het koelhuisgebrek mede zou kunnen worden veroorzaakt door een enzym dat als werkzaam bestanddeel koper bevat. Door toevoeging van TATD wordt het enzym geïnactiveerd daar het koper migreert naar de vetfase. Voegde hij 0,003% van het cuprizout van diethyldithiocarbaminezuur toe, waardoor geen koper wordt verplaatst, dan ontstond het gebrek tranig evenmin. Hieruit zou volgen dat het dithiocarbaminaation een direct remmende werking op het koperhoudend enzym uitoefent.

#### 4.6. Temperatuurbehandeling van de room

Door room op hoge temperatuur te verhitten (bijv. 10–30 sec op 90–96°C) ontstaan zg. „actieve sulfhydrylgroepen”, die het oxidatieproces in boter vertragen (TOWNLEY en GOULD, 1943). Als bron van de actieve SH-groepen wordt voornamelijk het  $\beta$ -lactoglobuline beschouwd. Ook het eiwit uit het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes draagt, hoewel in geringere mate, bij tot het gevormde reducerende systeem. De door verhitting ontstane verbindingen veroorzaken een kooksmaak die echter geleidelijk verdwijnt.

VAN HAEFTEN en PETTE (1953a) vergeleken de houdbaarheid van zomerboter bereid uit laag gepasteuriseerde room (70–72°C) met die bereid uit hoog gepasteuriseerde room (90°C). De uit laag gepasteuriseerde room bereide boter was na uitslag uit het koelhuis (na resp. 3, 6 en 8 maanden), beduidend slechter van kwaliteit dan de boter bereid uit hoog gepasteuriseerde room.

#### 4.7. Het karntype en de bewerking van de boter

PLATON c.s. (1945) voerden vergelijkende proeven uit met een houten karn zonder walsen en een karn met walsen. Koelhuisgebreken kwamen in boters bereid in de karn zonder walsen meer voor dan in boters uit de karn mét walsen. Verder bleek dat een lage kneedsnelheid, gepaard gaande met een lange bewerkingstijd, een minder goede houdbaarheid van de boter tengevolge had dan indien een hoge kneedsnelheid en een korte bewerkingstijd werden toegepast. Deze onderzoeken werden bevestigd door MALM (1956). Een verklaring voor dit interessante verschijnsel werd niet gegeven.

De recente ontwikkeling van roestvrij stalen karnen heeft het mogelijk gemaakt de bewerking onder een gedeeltelijk vacuüm te doen geschieden. Volgens STORGÅRDS en AULE (1956) wordt de houdbaarheid hierdoor niet verbeterd, hetgeen werd bevestigd door YSTGAARD en KORVALD (1956). Dit zou volgens laatstgenoemde auteurs echter alleen gelden voor boters met een joodgetal beneden 36.

SWARTLEY c.s. (1956) daarentegen constateerden een geringe, doch uit commercieel oogpunt niet significante verbetering van de houdbaarheid indien een vacuümbehandeling werd toegepast. NAGAB c.s. (1957) beschrijven experimenten waarin kneden onder vacuüm werd vergeleken met kneden in een stikstofatmosfeer. Eerstgenoemde methode zou de beste resultaten geven.

Door de FNZ (1949) werd eveneens een onderzoek ingesteld naar de invloed van zuurstof op het ontstaan van koelhuisgebreken in boter. De boter die werd bereid en verpakt in een stikstofatmosfeer werd in verse toestand lager gewaardeerd dan de normaal bereide boter. Na bewaring in het koelhuis gold het omgekeerde, maar vermoedelijk gaat de betere kwaliteit van de onder stikstof bereide boter na uitslag uit het koelhuis vrij spoedig verloren. Tot nu toe heeft deze vrij gecompliceerde werkwijze geen ingang gevonden in de praktijk.

Tenslotte kan over deze door de FNZ verrichte proefnemingen nog worden opgemerkt dat het weinig zin heeft conclusies te verbinden aan deze min of meer slordig opgezette experimenten. Bovendien is het niet waarschijnlijk dat in onder stikstof bereide boter, zuurstof de beperkende factor is.

#### 4.8. Licht

STORGÅRDS en HIETARANTA (1949) bestraalden botervet met ultraviolet licht en namen een sterk vissige smaak waar vóórdat het vet talkig werd. VAN HAEFTEN en PETTE

(1953b) konden deze waarneming echter niet bevestigen. Typische koelhuisgebreken werden door bestraling van boter of botervet met ultra-violet licht niet verkregen. Wél trad een verf- of lijnolieachtige smaak sterk op de voorgrond. De oxidatie is, gezien de vrij hoge temperatuur van de boter c.q. het botervet na bestraling ( $>40^{\circ}\text{C}$ ), vermoedelijk veel verder voortgeschreden dan normaal het geval is bij koelhuisboter. De smaakafwijking vervig-talkig duidt in de richting van oxidatie van de lager onverzadigde vetzuren (voornamelijk olie- en linolzuur), hetgeen, zoals onder 3 is aangegeven, aanleiding geeft tot het genoemde gebrek.

Hetzelfde effect werd verkregen indien botervet in het donker werd bewaard bij  $37^{\circ}\text{C}$ . Werd daarentegen het botervet bewaard bij resp. 14 en  $10^{\circ}\text{C}$ , dan was het smaakverloop te vergelijken met dat van botervet uit koelhuisboter. Een vissige smaak werd echter niet waargenomen.

Bij belichting van boter, speciaal met licht van korte golflengten ( $<4500 \text{ \AA}$ ), ontstaan vrij spoedig smaakafwijkingen. Een overmatige invloed van het licht is niet denkbeeldig, gezien de verbeterde industriële verlichting en de moderne verkoopmethoden, waarbij boter vaak in verlichte koelvitruines wordt bewaard. Vastgesteld werd, dat belichting van in perkamentpapier verpakte boter niet zonder gevaar is (MALM en HILDINGSON, 1955).

#### 4.9. Zout

Volgens WILEY (1939) zou toevoeging van zout aan boter de gevoeligheid voor het ontstaan van oxidatiegebreken doen toenemen. LOFTUS-HILLS (1949) bevestigde deze waarneming door experimenten met botervet. Hij stelde de hypothese dat na de initiële oxidatie, waarbij hydroperoxiden zijn gevormd, deze in zuur milieu reageren met H- en Cl-ionen. Dit zou aanleiding geven tot het ontstaan van actief chloor, dat de oxidatie van onverzadigde vetzuren katalyseert. Experimenteel werd vrij chloor aangetoond. Tevens werd vastgesteld dat de oxidatie van botervet hierdoor wordt versneld. Het door hem voorgestelde mechanisme geeft echter niet zonder meer een directe verklaring van de invloed van zout in boter. In boter is het zout opgelost in de waterfase en niet in de vetfase zodat de vraag blijft of de contactmogelijkheden dezelfde zijn.

VAN HAEFTEN en PETTE (1953a, b) toonden aan dat de vermindering in stabiliteit van boter als gevolg van het zouten, slechts gering was. Er was weinig verschil in smaak en in peroxidegetal tussen ongezoeten boter en uit dezelfde room bereide gezouten boter.

#### 4.10. Het wassen van de boter

In verschillende boterproducerende landen zijn vergelijkende proeven genomen over de invloed van het wassen van de boterkorrels op de kwaliteit van de boter. De

experimenten die werden verricht in Australië (MULLER, 1955), Nieuw Zeeland (McDOWELL c.s., 1953) en Canada (WHITE c.s., 1957) hadden betrekking op zoete boter. Gebleken is dat het al of niet wassen van de boter geen verschil in kwaliteit tengevolge had. Dit gold zowel voor verse als voor koelhuisboter. Koelhuisgebreken zijn in dit geval ook niet te verwachten.

FISKER c.s. (1955-1956) toonden aan dat, indien boter werd bereid uit gezuurde room, geen verschil in houdbaarheid kon worden geconstateerd tussen gewassen en ongewassen boter. De door de Centrale Commissie voor Zuiveltechniek van de FNZ genomen praktijkproeven (1959) bevestigden deze conclusie.

#### 4.11. De bewaartemperatuur van de boter

PONT en GUNNIS (1958) bewaarden een groot aantal monsters zoete boter gedurende 3 en 6 maanden bij temperaturen van resp.  $-11$ ,  $-18$  en  $-23^{\circ}\text{C}$ . Zij stelden vast dat bewaartemperaturen lager dan  $-11^{\circ}\text{C}$  slechts niet-significante verbeteringen in kwaliteit ten gevolge hadden.

THOMÉ (1953) is van mening dat temperaturen tussen  $-15$  en  $-20^{\circ}\text{C}$  voldoende zijn en dat zeer lage temperaturen ( $-25$  tot  $-30^{\circ}\text{C}$ ), zoals die bijvoorbeeld in Amerika worden toegepast, economisch niet zijn verantwoord.

MOHR (1958) propageert een koelhuistemperatuur van  $-10$  tot  $-12^{\circ}\text{C}$ . Indien boter echter langer dan 5 maanden moet worden bewaard, zijn lagere temperaturen ( $-18$  tot  $-20^{\circ}\text{C}$ ) noodzakelijk.

Door de FNZ (1933-1938) werden eveneens bewaarproeven uitgevoerd met boter. Gezien de resultaten van deze proeven is het in ons land gebruikelijk boter bij  $-10^{\circ}\text{C}$  op te slaan. MEYKNECHT en VAN DAM (1959) onderzochten of het wenselijk zou zijn deze temperatuur verder te verlagen tot  $-15^{\circ}\text{C}$ . Uit hun experimenten is gebleken dat de houdbaarheid van ongezoeten boter uit gezuurde room, bewaard bij  $-15^{\circ}\text{C}$ , significant beter was dan die van boter bewaard bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . Het verschil in kwaliteit was echter klein en kon voor praktische doeleinden worden verwaarloosd.

In hoeverre een verlaging van de bewaartemperatuur tot een temperatuur waarbij het gebonden water in de boter eveneens in vaste toestand overgaat een significante verbetering in houdbaarheid ten gevolge zal hebben, is nog niet onderzocht.

#### 4.12. Het seizoen

Volgens AAS en BORG (1941) zou winterboter beter houdbaar zijn dan zomerboter. KEESTRA (1951) acht dit echter niet bewezen. Uit bewaarproeven van VAN HAEFTEN en PETTE (1953b) is gebleken dat de duurzaamheid van winterboter geringer is dan die van zomerboter, hoewel de smaakafwijkingen een minder extreem verloop hadden.

PYANOWSKI c.s. (1956, 1957) namen waar dat melk van koeien met een hoge melk-



produktie over het algemeen meer immuunglobulinen bevat dan melk van koeien met een lage melkproduktie. De stabiliteit van het botervet zou in het eerste geval geringer zijn dan in het tweede. De oxidatief-synergistische invloed van de immuunglobulinen op het melkvet zou zich in de zomermaanden duidelijker manifesteren dan in de wintermaanden (DŁUŻEWSKA, 1959). De hiervoor aangevoerde bewijsgronden zijn echter allerm minst overtuigend.

## CONCLUSIE

Het onderzoek naar de invloed van al deze min of meer samenhangende factoren heeft niet geleid tot een oplossing van het probleem. Op een aantal van deze factoren, zoals bijv. de aard en de samenstelling van melk, kan geen of weinig directe invloed worden uitgeoefend.

Uit het literatuuroverzicht komt echter naar voren dat aandacht zal moeten worden besteed aan de wijze waarop het koper in de boter en de pH van het boterserum hun invloed doen gelden in de boter. Deze beide factoren bepalen immers grotendeels de houdbaarheid van boter in het koelhuis.

## DE MELKFOSFATIDEN

### 1. INLEIDING

Het vet in plantaardige en/of dierlijke weefsels bevat behalve triglyceriden o.a. fosfatiden die fosfor en stikstof bevatten. VAUQUELIN (1802) isoleerde ze voor het eerst uit hersenweefsel. Wat de kwantitatieve aspecten van de isolatie betreft, is het niet zonder meer mogelijk verband te leggen tussen de hoeveelheid fosfor in de vetfractie en het fosfatidegehalte van het onderzochte weefsel. Behalve fosfor- bevattende vetachtige stoffen komen in weefsels nl. ook niet-vetachtige fosforverbindingen voor die met organische oplosmiddelen extraheerbaar zijn.

Alhoewel het inzicht in de samenstelling van de fosfatiden aanmerkelijk is verdiept, kan over de wijze waarop ze in het levend organisme voorkomen nog maar weinig met zekerheid worden gezegd. Het is bekend dat fosfatiden met o.a. eiwitten en suikers complexen vormen. De kwantitatieve afscheiding van fosfatiden levert daardoor grote moeilijkheden op. Fosfatiden hebben zowel hydrofiele als hydrofobe eigenschappen. Bij extractie met niet geschikte oplosmiddelen bestaat enerzijds het gevaar van een onvolledige extractie (te hydrofoob oplosmiddel), anderzijds is het risico aanwezig van gelijktijdige extractie van bijv. fosfaten (te hydrofiel oplosmiddel). Het is daarom begrijpelijk dat in de loop der jaren een groot aantal extractietechnieken zijn ontwikkeld.

### 2. WIJZE WAAROP FOSFATIDEN IN DE MELK VOORKOMEN

MULDER (1942) stelde vast dat melk 0,03–0,04% fosfatiden bevat, ondermelk ca. 0,015%. Uit deze gegevens kan de conclusie worden getrokken dat de melkvetbolletjes fosfatiden bevatten. Aangezien in het vet zelf geen fosfatiden voorkomen, moeten deze verbindingen zich bevinden in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Als vaststaand kan worden aangenomen dat ze hierin in een complexe vorm met eiwitten aanwezig zijn, hetgeen tot gevolg heeft dat deze associatie moet worden verbroken om de fosfatiden te kunnen isoleren.

Volgens RIMPILA en PALMER (1935) bevatten de vetbolletjes van gewassen room 170–290 mg fosfatiden per 100 g vet. HEINEMANN (1939) en JENNESS en PALMER (1945a) stellen de hoeveelheid op resp. 270–280 en 180–340 mg/100 g vet. Het gevaar bestaat echter dat door het wassen van de room een gedeelte van het oppervlaktelaagje wordt verwijderd (MULDER, 1957), waardoor te lage waarden worden verkregen.

MULDER c.s. (1957) bepaalden de verdeling van de fosfatiden over de vet- en water-

fase van de melk door middel van een oproommethode en kwamen daarbij tot de conclusie dat per 100 g vetbolletjes ca. 600 mg fosfatiden werden gebonden. In het plasma kwamen per 100 g gemiddeld 16 mg fosfatiden voor. Van de totale hoeveelheid fosfatiden in de melk is dus ca. 60% aanwezig in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Dit laagje zou voor 20-30% uit fosfatiden bestaan.

Over de wijze waarop de fosfatiden in de serumfase zijn gebonden is weinig bekend. Gezien het feit dat ze echter moeilijk extraheerbaar zijn met apolaire oplosmiddelen, ligt het voor de hand te veronderstellen dat ze ook in deze fase in een complexe vorm aanwezig zijn.

### 3. EXTRACTIEMETHODEN

#### 3.1. Literatuuroverzicht

Indien men in melk het gehalte aan lipide-fosfor wil bepalen, bestaat niet alleen de kans op een onvolledige extractie van de fosfatiden, maar ook kan niet-lipide-fosfor mede worden geëxtraheerd. Zoals in de inleiding reeds is opgemerkt, is het daarom niet verwonderlijk dat successievelijk een groot aantal extractiemethoden zijn ontwikkeld. In principe kan men hierbij twee methoden onderscheiden (MULDER, 1942), nl. extractie van gedroogde produkten en extractie langs „natte” weg. Veelal wordt aan de laatste methode de voorkeur gegeven. Behalve alcohol wordt dan een oplosmiddel toegepast waarin de fosfatiden goed oplosbaar zijn.

BLOOR (1914) maakte gebruik van een ethanol-ether mengsel voor de extractie van fosfatiden uit bloed. Daar sfingomyeline slecht oplosbaar is in ether zullen onvermijdelijk verliezen optreden. Extractie met uitsluitend ethanol leidt tot verliezen aan fosfatiden die inositol bevatten.

De methode van BLOOR werd door verschillende onderzoekers toegepast op melk (HESS en HOLMAN, 1925; BURUIANA en FURTUNESCO, 1941). Anderen maakten eveneens gebruik van deze methode, doch extraheerden het aldus verkregen extract met chloroform, daar door ethanol en ether ook anorganische fosfaten worden geëxtraheerd. HOLWERDA (1936) wees op de mogelijke aanwezigheid van een fosforzure ester in het ethanol-ether extract.

MULDER (1942) paste de (vet-)extractiemethode van Röse-Gottlieb toe, hetgeen het voordeel heeft dat meer ether dan ethanol wordt gebruikt; bovendien worden na toevoeging van petroleumether sterk hydrofiele fosforverbindingen verwijderd.

KOOPS (1957) maakte gebruik van een ethanol-tetrachloorkoolstof mengsel. Tetrachloorkoolstof heeft verschillende voordelen: een sterk oplossend vermogen voor het gehele fosfatide-complex en gemakkelijke separatie van water. Bovendien geeft een tetraextract van fosfatiden bij uitschudden met water praktisch geen verliezen aan lipide-fosfor (VAN HANDEL, 1954; KOOPS, 1958).

Het met organische oplosmiddelen geëxtraheerde materiaal bevat behalve vet en

fosfatiden nog in vet en in water oplosbare verontreinigingen. De in water oplosbare verontreinigingen kunnen worden verwijderd door het tetraextract te schudden met gedestilleerd water. Om vervolgens de fosfatiden te kunnen isoleren uit het aldus gedeeltelijk gereinigde extract, werd door verschillende onderzoekers gebruik gemaakt van het feit dat fosfatiden onoplosbaar zijn in aceton (BLOOR, 1915; LEA en RHODES, 1953). De aanwezigheid van triglyceriden doet de oplosbaarheid van fosfatiden in aceton echter sterk toenemen (PATTERSON en RIDOUT, 1958), waardoor het gevaar bestaat dat de precipitatie met aceton niet kwantitatief is. Bovendien zijn de in aceton oplosbare fosfatiden sterker onverzadigd dan de onoplosbare (SMITH en JACK, 1959), hetgeen wordt gedemonstreerd door de gegevens verzameld in tabel 4. Zuivering

Tabel 4. Onverzadigde vetzuren van in aceton oplosbare en van in aceton onoplosbare fosfatiden.

	Fosfatiden, in aceton	
	oplosbaar	onoplosbaar
Joodgetal	58,8	49,1
Monocœen, ber. als oliezuur	24,4	24,3
Dieën, geconjugeerd	2,4	1,2
Dieën	6,3	5,1
Trieën	2,4	2,2
Tetraeën	2,0	1,3
Pentaeën	2,0	1,5

Table 4. *Unsaturated fatty acids of acetone-soluble and -insoluble milk phospholipids.*

door middel van aceton-precipitatie zou resulteren in een selectieve concentratie van sflngomyeline en de meer verzadigde fosfatiden in de fractie die in aceton onoplosbaar is. Wegens het ontbreken van een betere methode is de aceton-procedure gedurende lange tijd in zwang geweest. Dank zij de recente ontwikkelingen van chromatografische technieken is men er in geslaagd een betere methode te vinden. Hierop zal onder 3.3.3 nader worden teruggekomen.

### 3.2. Uitgangsmateriaal voor de isolatie van fosfatiden

In verband met de wenselijkheid te kunnen beschikken over vrij grote hoeveelheden melkfosfatiden werd gezocht naar een methode waarmee enkele grammen van deze verbindingen konden worden geïsoleerd. Het is duidelijk dat melk geen geschikt object is om fosfatiden uit af te zonderen, daar het gehalte aan fosfatiden in melk slechts 0,03 a 0,04% bedraagt (MULDER, 1942). Room (25% vet) bevat ca. 0,15% fosfatiden en zou als uitgangsmateriaal dus veel beter geschikt zijn dan melk. Het nadeel is echter dat ook aanzienlijke hoeveelheden vet worden geëxtraheerd. Het gehalte aan

fosfatiden van karnemelk verkregen uit room met vetgehalten van 20 en 40% bedraagt resp. ca. 0,08 en 0,24% (MULDER, 1942, 1947), het vetgehalte is laag (<1%). Boter bevat ca. 0,2% fosfatiden (HOLM c.s., 1936), hetgeen betekent dat na uitsmelten van de boter 2 g fosfatiden in 160 ml serum voorkomen. Boter is dus de geschiktste grondstof voor de isolatie van fosfatiden. In de onderhavige onderzoeken werd vrijwel altijd uitgegaan van boter uit gezuurde room. Tijdens de isolatie werd getracht oxidatie van de fosfatiden zoveel mogelijk te beperken.

### 3.3. Toegepaste isolatiemethoden

#### 3.3.1. *Isolatie van fosfatiden uit boterserum door middel van de methode Röse-Gottlieb (M1)*

Boter werd in centrifugebuizen bij een zo laag mogelijke temperatuur (ca. 40°C) gesmolten en gecentrifugeerd. De bovenstaande vetlaag werd zo volledig mogelijk afgeschonken, het overgebleven vetlaagje kon na het stollen gemakkelijk met een spatel worden verwijderd. Het serum werd vervolgens weer verwarmd tot een temperatuur van 40°C en opnieuw gecentrifugeerd. Het resterende vetlaagje werd met petroleumether verwijderd. Per 100 ml serum werden vervolgens resp. 20 ml ammonia 6 N, 100 ml ethanol 96%, 250 ml peroxidevrije ether en 250 ml petroleumether toegevoegd. Na elke toevoeging werd geschud. Deze extractie werd tweemaal herhaald met telkens 150 ml ether en 150 ml petroleumether. De gezamenlijke ether-petroleumetherextracten werden, onder doorleiding van gezuiverde stikstof, bij verminderde druk geconcentreerd, waarna aan het residu 300 ml aceton (24°C) werd toegevoegd. Het gevormde neerslag werd afgefiltreerd, opgelost in een weinig chloroform en na filtratie opnieuw neergeslagen door middel van aceton. Deze bewerking werd driemaal herhaald, waarna de fosfatiden in vacuüm werden gedroogd. De N/P verhouding van het aldus geïsoleerde preparaat bedroeg 1,2.

#### 3.3.2. *Isolatie van fosfatiden uit boterserum door middel van ethanol-tetrachloorkoolstof (M2)*

Boterserum, dat werd verkregen als is beschreven onder 3.3.1., werd bij kamertemperatuur druppelsgewijze toegevoegd aan een zesvoudige hoeveelheid mengsel van ethanol (96%) en tetrachloorkoolstof (4 : 1, v/v). De hoeveelheden ethanol en tetrachloorkoolstof in het mengsel waren zodanig gekozen, dat na toevoeging van het boterserum de eiwitten werden neergeslagen en de met water verdunde ethanol zich niet afscheidde van de tetrachloorkoolstof. Na een nacht bewaren (in het donker, bij kamertemperatuur) werden neerslag en oplossing gescheiden. Het neerslag werd nog driemaal geëxtraheerd met telkens 100 ml van het ethanol-tetrachloorkoolstofmeng-

sel, waarna de gezamenlijke extracten bij verminderde druk, onder doorleiding van gezuiverde stikstof, werden geconcentreerd tot ongeveer het oorspronkelijke volume van het boterserum was bereikt. Na krachtig schudden met 100 ml tetrachloorkoolstof werd gecentrifugeerd. De laag tetrachloorkoolstof werd vervolgens afgepipetteerd. Deze extractie werd nog tweemaal herhaald, waarna de gezamenlijke extracten, onder doorleiding van gezuiverde stikstof, werden geconcentreerd. Het tetrachloorkoolstof-extract werd driemaal gewassen met telkens 100 ml 0,25 M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ . De porties waswater werden gezamenlijk nog eens tweemaal met telkens 100 ml tetrachloorkoolstof uitgeschud. De bij elkaar gevoegde tetrachloorkoolstofextracten werden bij verminderde druk, onder doorleiding van gezuiverde stikstof, geconcentreerd en daarna gefiltreerd. Vervolgens werd aan dit extract een twaalfvoudige hoeveelheid aceton ( $24^\circ\text{C}$ ) toegevoegd. Het gevormde neerslag werd opgelost in tetrachloorkoolstof, waarna de fosfatiden weer werden geprecipiteerd met aceton. Deze bewerking werd tweemaal herhaald. De fosfatiden werden vervolgens in vacuüm gedroogd. Het fosforgehalte (SCHEELE, 1936) van de op deze wijze geïsoleerde fosfatiden was 3,85%, het stikstofgehalte (micro-Kjeldahl) bedroeg 2,1% ( $\text{N/P} = 1,2$ ). Voor wat betreft de uiteindelijke opbrengst aan fosfatiden gaf deze methode betere resultaten dan de voorgaande (KOOFS, 1957). Een bezwaar blijft echter dat ook in deze methode het kwantitatieve aspect niet tot zijn recht komt, daar de gevolgde aceton-procedure aanleiding geeft tot niet reproduceerbare verliezen (ca. 15–25%).

RHODES en LEA (1958) vervingen de aceton-behandeling door een chromatografische scheidingstechniek.

### *3.3.3. Zuivering van het ruwe, niet met aceton behandelde tetraextract door middel van een chromatografische methode (M3)*

Een ruw, gewassen tetraextract (verkregen als beschreven onder 3.3.2) werd bij verminderde druk, onder doorleiding van gezuiverde stikstof, geconcentreerd en opgenomen in chloroform-methanol (98 : 2, v/v). De oplossing werd op een kolom gebracht bestaande uit 26 g silicagel (Mallinckrodt, 100 mesh A.R.) in chloroform-methanol (98 : 2). De hoogte van de kolom bedroeg  $\pm 10$  cm, de doorsnede  $\pm 2,8$  cm. De vetfractie werd geëluëerd met 250 ml chloroform-methanol (98 : 2), de fosfatiden met 550 ml methanol-chloroform-water (70 : 25 : 5, v/v). Per kolom werd niet meer dan 20 mg lipide-fosfor opgebracht, de verliezen waren zeer gering ( $<1\%$ ). De fosfatide-oplossing werd bij verminderde druk, onder doorleiding van gezuiverde stikstof, geconcentreerd, waarna de droogrest werd opgenomen in tetrachloorkoolstof.

Bij de onderhavige onderzoeken werden alle drie de methoden toegepast. Methode M1 die het eerst werd ontwikkeld, sluit nauw aan bij de reeds in de literatuur beschreven werkwijzen. Lecithine en cefaline worden in alkalisch milieu echter vrij snel gehydrolyseerd; mogelijk treden er verliezen op ten gevolge van het sterk alkalisch

maken van het boterserum door de toevoeging van ammonia. Dit was de reden dat werd omgezien naar een andere extractiemethode (M2), waaruit tenslotte methode M3 resulteerde. Deze methode ondervangt de bezwaren die inhererent zijn aan de voorgaande methoden. In het vervolg zal steeds worden aangegeven op welke wijze de fosfatiden, die bij de experimenten werden gebruikt, zijn geïsoleerd.

#### 4. SAMENSTELLING VAN DE FOSFATIDEN

##### 4.1. Inleiding

De literatuur bevat slechts weinig gegevens over de samenstelling van de fosfatiden in boter. PALMER en WIESE (1933) en KURTZ c.s. (1934) stelden vast dat in melk lecithine, cefaline en sfingomyeline voorkomen. Volgens laatstgenoemde onderzoekers zouden de fosfatiden in karnemelk voor 60% bestaan uit lecithine, 32% zouden als cefaline en 8% als sfingomyeline aanwezig zijn.

BALIGA en BASU (1955, 1956) pasten voor het eerst een chromatografische methode toe om de samenstelling van de fosfatiden te bepalen. Na extractie van de fosfatiden (uit melk, room, karnemelk en boter) adsorbeerden zij de cefalinegroep aan magnesiumoxide en pasten vervolgens een selectieve hydrolyse met KOH toe om lecithine in aanwezigheid van sfingomyeline te bepalen. De verhouding lecithine: cefaline: sfingomyeline zou 30 : 45 : 25 zijn. De cefalinegroep werd echter niet nader geanalyseerd, daar ze bij de analyse verloren ging. Voor melk, room en karnemelk werden tamelijk constante waarden gevonden, in boter was deze verhouding echter aan variaties onderhevig.

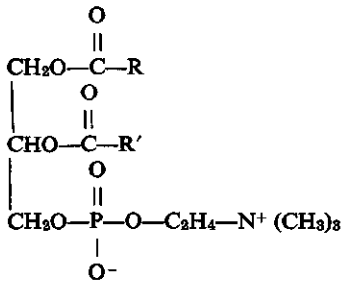
RHODES en LEA (1958) gebruikten voor hun chromatografische scheidingsmethode een extract van zoete karnemelk, dat zij representatief achtten om te dienen als uitgangsmateriaal voor de bepaling van de samenstelling van de fosfatiden in melk. De fosfatiden in karnemelk zouden volgens genoemde auteurs als volgt zijn samengesteld (in mol. %): lecithine (fosfatidylcholine) 33, cefaline 44, sfingomyeline 19, acetaalfosfatiden 3. De cefaline-fractie werd nader geanalyseerd en bevatte, berekend op de totale hoeveelheid fosfatiden (in mol. %): fosfatidylethanolamine 29, fosfatidylserine 10 en inositol-bevattende fosfatiden 5.

MCDOWELL (1958) bepaalde eveneens de samenstelling van de fosfatiden van melk, room, ondermelk, karnemelk en zoete boter. De groep der cefalinen werd echter niet nader geanalyseerd. De verhouding (in bovengenoemde volgorde) zou 30 : 37 : 33 bedragen.

##### 4.2. Eigen onderzoek

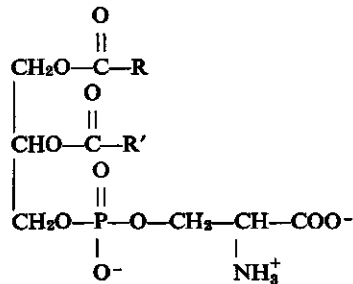
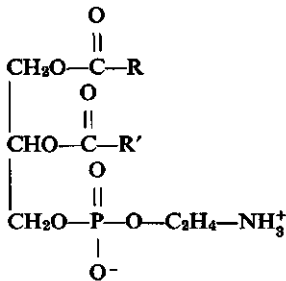
Alvorens over te gaan tot het bespreken van de gevolgde bepalingsmethodiek, volgen hieronder de chemische formules van de verschillende fosfatide-fracties:

1. lecithine of fosfatidylcholine (JUKES, 1934)

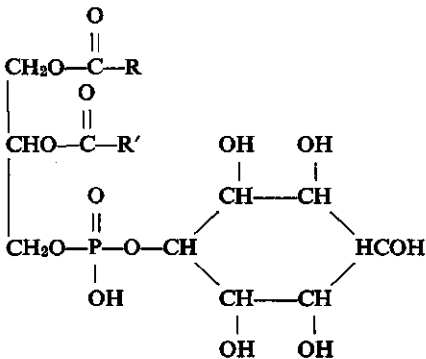


2. de cefalinegroep

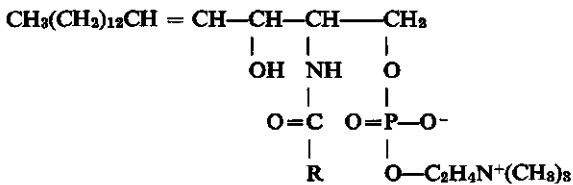
a. fosfatidylethanolamine (FOLCH, 1942)    b. fosfatidylserine (FOLCH, 1948)



c. inositol-bevattende fosfatiden (OKUHARA, NAKAYAMA, 1955)



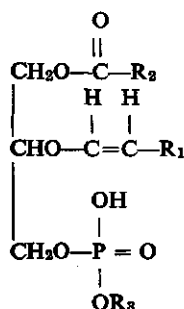
3. sfingomyeline (ROUSER c.s., 1953)



waarin R en R' vetzuurresten voorstellen.



#### 4. acetaalfosfatiden (RAPPORT c.s., 1957)



waarin  $\text{R}_1$  en  $\text{R}_2$  alifatische ketens voorstellen van resp. aldehyden en vetzuren en  $\text{R}_3$  de bekende groeperingen colamine, serine of choline.

Het bepalen van de fosfatide-fracties kan geschieden door de hydrolyseproducten nader te analyseren. Deze zijn: choline, ethanolamine, serine, inositol, sphingosine, glycerofosforzuur, glycerol, fosforzuur en vetzuren. Door hydrolyse met KOH wordt alleen de lecithinecholine vrijgemaakt en door zure hydrolyse tevens die van sfingomyeline. Indien ook de hoeveelheid fosfor die vrijkomt door alkalische hydrolyse bekend is, kunnen zowel lecithine als de cefalinegroep worden berekend. Schematisch ziet deze berekening er als volgt uit (FORMYNE c.s., 1957):

1. lecithine = choline na alkalische hydrolyse — niet-fosfatide-choline
  - 2a. cefaline = totaal fosfor — (totaal choline — niet-fosfatide-choline)
  - 2b. cefaline = fosfor na alkalische hydrolyse — (choline na alkalische hydrolyse — niet-fosfatide-choline)
  - 2c. cefaline = ethanolamine + serine + inositol
  - 3a. sfingomyeline = totaal choline — (lecithine-choline + niet-fosfatide-choline)
  - 3b. sfingomyeline = fosfor uit onverzeepbaar gedeelte na alkalische hydrolyse
  - 3c. sfingomyeline = totaal fosfor — fosfor na alkalische hydrolyse
- waarin alle waarden zijn uitgedrukt in millimolen. Na omrekening op m.molen P volgt uit het totaal P-gehalte van het extract het procentuele aandeel van elke component.

#### 4.3. Experimentele bijzonderheden

Uitgegaan werd van 75 ml serum van boter uit gezuurde room. Hiervan werd een niet-gewassen M2-extract bereid, waarbij de aceton-precipitatie achterwege werd gelaten. Na aanvulling tot 100 ml werd 98 ml van dit extract gewassen, waarna het gewassen extract werd geconcentreerd en aangevuld tot 100 ml. Om de opbrengst aan lipide-fosfor te kunnen vergelijken, werd uit dezelfde boter een M1-extract bereid, eveneens zonder aceton-precipitatie. Bij alle uitgevoerde bepalingen werden blanco waarden vastgesteld.

#### *4.3.1. Fosforbepaling in het Röse-Gottlieb-extract van boterserum, in tetraextracten en in hydrolysaten van fosfatiden*

De P-analyses werden uitgevoerd volgens de methode van GRISWOLD c.s. (1951); de extincties werden gemeten met behulp van een Unicam spectrofotometer SP 500 bij 820 m $\mu$  in een 1 cm cuvet, waarbij rekening werd gehouden met de eigenwaarde van de cuvetten.

De extincties van bekende hoeveelheden P werden bepaald, uitgaande van standaardoplossingen van resp. 43,9 en 87,8 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/200 ml gedestilleerd water. Vijf ml van elk van deze oplossingen werden verdund tot 500 ml. Per 5 ml verdunning bedraagt de hoeveelheid P dan resp. 2,5 en 5,0  $\mu$ g. De extincties van deze hoeveelheden fosfor in een volume van 10 ml bedroegen resp. 0,218 en 0,432. Er werd steeds gemeten in het gebied van 2,5–5,0  $\mu$ g P.

Opgemerkt werd dat de concentratie aan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in het gedeelte van het destruaat waarin het fosfor wordt bepaald zodanig dient te zijn, dat de concentratie na verdunning tot 10 ml 1 N is. Destructierekjes met elektrische verwarming kunnen bij een verkeerd gebruik aanleiding geven tot oververhitting, met als gevolg verlies aan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Het verdient daarom aanbeveling voor de micro-P-bepaling destructierekjes te gebruiken met micro-gasbranders. Het is tevens van belang dat het benodigde glaswerk wordt bewaard in verdund salpeterzuur en dat het vóór gebruik wordt uitgespoeld met gedestilleerd water.

##### **1. Boterserum**

Vijf ml boterserum (in triplo) werd geëxtraheerd volgens de methode van Röse-Gottlieb. Het residu van de ether-petroleumetherextracten werd gedestruëerd met 10 ml van een mengsel van H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en HNO<sub>3</sub> (1 : 1, beide geconcentreerd). Na destructie werden zodanige verdunningen gemaakt, dat de extinctie van de lipidefosfor van 0,01 ml serum werd gemeten.

##### **2. Tetraextracten**

Van de tetraextracten (gewassen en niet-gewassen) werd 1 ml (in duplo) gedestruëerd. Toegevoegd werd 2 ml van een mengsel van H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en HNO<sub>3</sub>. Na destructie werden zodanige verdunningen gemaakt, dat de extinctie van de lipidefosfor van 0,0075 ml serum werd gemeten.

##### **3. Hydrolysaten van fosfatiden**

Na hydrolyse werden gedeelten van de hydrolysaten gedestruëerd met 2 ml van een mengsel van H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en HNO<sub>3</sub>, waarna de hoeveelheden fosfor werden bepaald.

#### *4.3.2. Overige bepalingen*

Het stikstofgehalte werd bepaald volgens een micro-Kjeldahl-methode. De alkalische hydrolyse geschiedde volgens de aanwijzingen van HACK (1947) en FORMYNE c.s. (1957), de zure hydrolyse volgens het voorschrift van HACK (1947). Het gehalte aan

choline werd bepaald overeenkomstig de methode van ENTENMAN c.s. (1944), niet-fosfatide-choline volgens FORMYNE c.s. (1957). De zure hydrolyse van de onverzeepbare rest na alkalische hydrolyse geschiedde volgens HACK (1947). De bepaling van ethanolamine en serine werd uitgevoerd in het zure hydrolysaat. Beide verbindingen werden omgezet in de DNP(2,4-dinitrofenylhydrazon)-derivaten volgens de methode van AXELROD c.s. (1953), de extincties werden spectrofotometrisch vergeleken met die van de DNP-derivaten van bekende hoeveelheden van deze verbindingen. Inositol werd niet alleen microbiologisch bepaald met behulp van de gist *Kloeckera apiculata* (Klöcker) Janke volgens de methode van CAMPLING en NIXON (1954), doch ook chemisch volgens BÖHM en RICHARZ (1954). Daartoe werd inositol door middel van papierchromatografie geïsoleerd uit het zure hydrolysaat. De acetaalfosfatiden werden bepaald volgens de methode van WITTENBERG c.s. (1956). Bovendien werden de te identificeren restgroepen papierchromatografisch gescheiden. Dit geschiedde in de eerste plaats om de zuiverheid van de fosfatide-extracten te controleren (DNP-verbindingen) en, zoals reeds is vermeld, met het oog op de chemische bepaling van inositol. Het zure hydrolysaat werd geconcentreerd en op Whatman nr. 1 in dalende chromatografie geëluëerd met n-butanol-ijsazijn-water: 4 : 1 : 2,5 (v/v). De R-waarden bedroegen voor inositol, serine, ethanolamine en choline resp. 0,10, 0,18, 0,32 en 0,40.

Ethanolamine en serine werden aangetoond met ninhydrine (0,4%) en azijnzuur (4%) in n-butanol, choline volgens LEVINE en CHARGAFF (1951) en inositol met het reagens van TREVELYAN c.s. (1950). Details van de gevolgde werkwijzen zijn reeds eerder beschreven (KOOPS, 1958).

#### 4.4. Resultaten

De te analyseren boter (uit gezuurde room) werd genomen uit de karn van de proef-fabriek van het NIZO in de maanden april, mei en juni. De resultaten van de drie experimenten zijn samengevat in tabel 5.

De hoeveelheid acetaalfosfatiden werd berekend als  $C_{16}$  aldehyde (mol. gew. 240; molaire extinctiecoëff.  $2,35 \times 10^4$ ). Voor de omrekening op acetaalfosfatiden werd het moleculair gewicht van deze verbindingen gesteld op 750. Het procentuele aandeel van de lecithine-fractie werd berekend uit de hoeveelheid choline na alkalische hydrolyse. De cefaline-fractie werd bepaald volgens de onder 4.2. aangegeven methode (kolom A-2c, kolom B-2a en 2b). De resultaten vermeld in kolom A voor de sfingomyeline-fractie werden verkregen uit 3a, die in kolom B uit 3b en 3c.

MCDOWELL (1958) stelde vast, dat door een mengsel van chloroform-methanol (1 : 1) méér lipide-fosfor uit boterserum werd geëxtraheerd dan met behulp van een gewijzigde Röse-Gottlieb-extractie (geen ammonia, serum 1 op 5 verdund met water). In het Röse-Gottlieb-extract was niet-fosfatide-fosfor afwezig, de in het chloroform-methanol-extract aanwezige niet-fosfatide-fosfor kon worden verwijderd door het extract te wassen met water. Dezelfde verschijnselen werden waargenomen voor de



ethanol-tetrachloorkoolstof-(M2)-methode ten opzichte van de Röse-Gottlieb (M1)-methode. WALSTRA en DE GRAAF (1962) wezen erop dat met behulp van de methode Röse-Gottlieb slechts dan een volledige extractie wordt verkregen, indien 1,5% natriumchloride wordt toegevoegd aan het te extraheren monster.

Uit de in tabel 5 vermelde resultaten blijkt dat door het wassen van het tetra-extract het gehalte aan fosfor slechts weinig wordt verlaagd. Het vet bevatte na voorzichtig uitsmelten van de boter, geen lipide-fosfor. Het extract kon, gezien de N/P verhouding van 1,23 representatief worden geacht voor de samenstelling van de fosfatiden van boter uit gezuurde room.

In de extracten kwam geen niet-fosfatide-choline voor, zodat de lecithine-fractie direct kon worden berekend uit de hoeveelheid choline na alkalische hydrolyse.

De resultaten van de op verschillende wijzen uitgevoerde cefalinebepalingen kwamen goed overeen. In de tabel zijn niet de resultaten vermeld van de experimenten waarbij de hydrolyse met 6 N HCl werd vergeleken met die in een oplossing van 6 N HCl in absolute methanol. Volgens OLLEY (1957) zou eerstgenoemde methode aanleiding geven tot verliezen aan lipide-stikstof (ethanolamine en serine). De verschillen waren echter gering. In het zure hydrolysaat kwamen geen andere, met ninhydrine kleurende verbindingen voor dan ethanolamine en serine. De hoeveelheid niet-geïdentificeerde stikstof bedroeg 3 à 4 mol. %. Er werden geen pogingen ondernomen om deze verbindingen te verwijderen door middel van chromatografie via cellulosepoeder (LEA en RHODES, 1953), daar hierdoor (geringe) verliezen aan fosfatide-fosfor optreden (HANAHAN c.s., 1957). Aangenomen werd dat het inositol aanwezig was als monofosfaat, alhoewel het niet uitgesloten moet worden geacht dat inositol ook kan voorkomen in de difosfaat-vorm (HAWTHORNE, 1956; MCKIBBIN, 1956). Het totaal stikstof (theoretisch) werd berekend uit de fosforbepalingen in de hydrolysaten; aangenomen werd dat het inositol-fosfatide géén en dat sfingomyeline twee stikstofatomen per fosforatoom bevat.

In het onverzeeppbare gedeelte (na alkalische hydrolyse) was de verhouding P/choline 1; dit gedeelte bestond dus uit sfingomyeline. De verhouding lecithine: (totaal) cefaline: sfingomyeline was 30 : 45 : 25, hetgeen overeenkomt met de verhoudingsgetallen van BALIGA en BASU (1955, 1956), McDOWELL (1958) en RHODES en LEA (1958), voor resp. melk, room en ondermelk; melk, room, ondermelk en karnemelk, en zoete boter en zoete karnemelk. Ook de hoeveelheid acetaalfosfatiden en de verhouding van de componenten van de cefaline-fractie stemmen overeen met de in de literatuur vermelde waarden (RHODES en LEA, 1958).

## 5. SCHEIDING IN COMPONENTEN

### 5.1 Inleiding

RHODES en LEA (1956, 1957, 1958) bepaalden, met gebruikmaking van de door hen ontwikkelde methode om de fosfatiden uit eidooier te scheiden, eveneens de samen-

stelling van de fosfatiden in zoete karnemelk. Een methanol-chloroform extract (1 : 1) van fosfatiden werd door middel van chromatografie over een cellulosekolom bevrijd van in water oplosbare verontreinigingen. Hierbij traden echter verliezen op aan lipide-fosfor (ca. 10%). Het vet werd verwijderd door chromatografie over een silicagelkolom met behulp van chloroform-methanol (98 : 2). Daarna werd geëluëerd met een methanol-chloroformmengsel (3 : 7), waarbij de cefaline-fractie het eerst als een snellopende band werd verkregen. Vervolgens werd met hetzelfde mengsel de lecithine-fractie geëluëerd. De sfigomyeline-fractie werd verkregen door elutie met een mengsel van methanol-chloroform-water (70 : 25 : 5).

## 5.2. Gevulde methodiek

### 5.2.1. Het verwijderen van vet uit een gewassen, niet met aceton behandeld M2-extract

Dit geschiedde volgens de onder 3.3.3. beschreven methode. Voor grote hoeveelheden fosfatiden (5–20 mg lipide-fosfor) werd 26 g silicagel gebruikt, voor kleinere hoeveelheden (tot 5 mg lipide-fosfor) 8 g gel. In het laatste geval werd geëluëerd met resp. 150 ml chloroform-methanol (98 : 2) en 150 ml methanol-chloroform-water (70 : 25 : 5). De bij de scheidingen gebruikte loopvloeistoffen werden gezuiverd volgens door VOGEL (1954) aangegeven methoden. Fig. 2 geeft schematisch het verloop van de elutie weer met de opeenvolgende loopvloeistoffen.

Fig. 2. Verwijdering van het vet uit een gewassen M2-extract (niet met aceton behandeld).

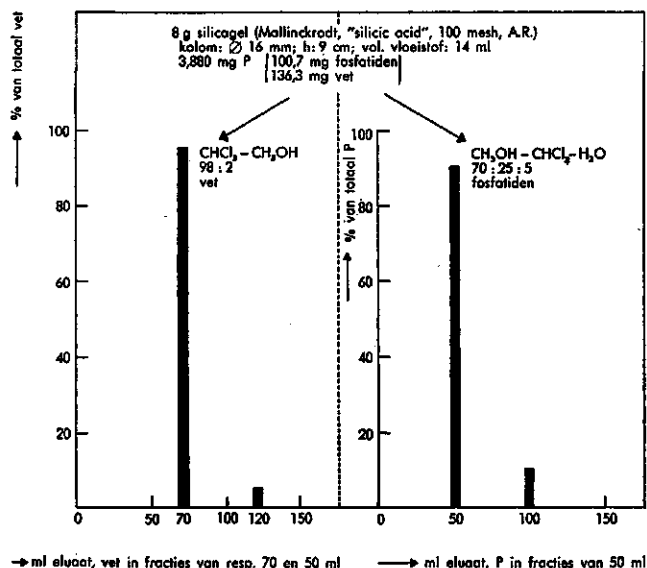


Fig. 2. Removal of fat from a washed M2-extract (not treated with acetone).

### 5.2.2. Scheiding van fosfatide-fracties uit een gewassen, niet met aceton behandeld M2-extract

Een glazen chromatografiebuis, voorzien van een gesinterde bodem en een glazen kraan, werd gevuld met 30 g aluminiumoxide (Alcoa, grade F<sub>20</sub>) in methanol-chloroform 1 : 1. Nadat een homogene kolomopbouw was verkregen werden de fosfatiden, die waren opgelost in hetzelfde mengsel van oplosmiddelen, opgebracht. De maximale belading bedroeg 20 mg lipide-fosfor per kolom. Vervolgens werd met 300 ml van dit mengsel geëluëerd. Het eluaat bevatte het vet, de lecithine- en de sfingomyeline-fractie. De aldus geëluëerde lipide-fosfor kwam, zoals bleek uit cholinebepalingen verricht in de alkalische- en zure hydrolysaten, geheel voor rekening van de genoemde fracties. Vervolgens werd geëluëerd met 900 ml van een mengsel van ethanol-chloroform-water (5 : 2 : 2). Het eluaat bevatte ethanolamine, serine en inositol en bestond dus uit de cefaline-fractie. Er was geen choline aanwezig. Fig. 3 geeft het verloop van

Fig. 3. Scheiding van fosfatiden in fracties uit een gewassen M2-extract (niet met aceton behandeld).

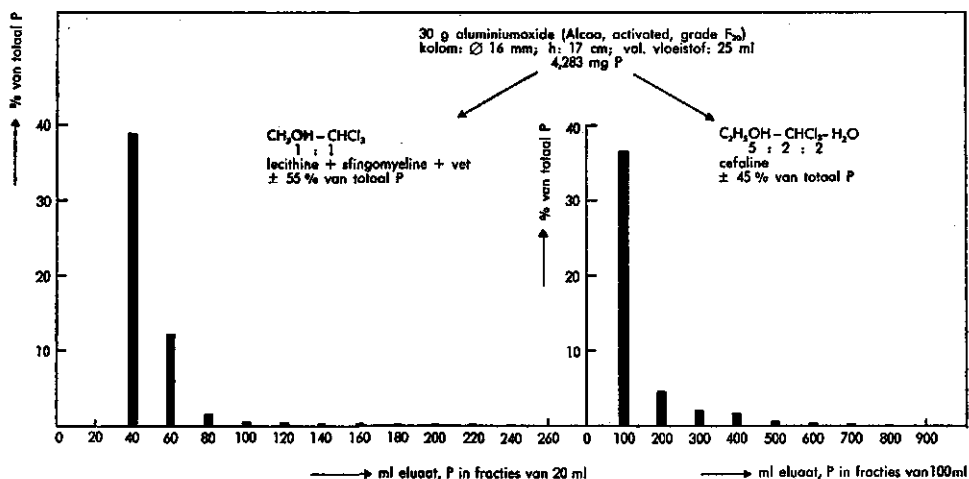


Fig. 3. Separation of phospholipids in fractions from a washed M2-extract (not treated with acetone).

de elutie met de verschillende loopvloeistoffen weer. Het eluaat werd bij verminderde druk, onder doorleiden van gezuiverde stikstof, tot ca. 200 ml geconcentreerd. De cefaline-fractie werd hieruit verkregen door na toevoeging van resp. 50 ml 0,1 M kaliumbiftalaat-natriumhydroxide buffer (pH 4,60) en 75 ml 96% ethanol, drie keer te extraheren met telkens 100 ml tetrachloorkoolstof. Ongeveer 5 à 10% van de cefaline-fractie bleef in de waterige vloeistof achter.

De vet-, lecithine- en sfingomyeline-fracties werden gescheiden op een kolom van 26 g silicagel. Daartoe werd het methanol-chloroform-extract bij verminderde druk, onder doorleiden van gezuiverde stikstof, drooggedampt; het residu werd opgenomen

in methanol-chloroform 3 : 7, opgebracht op de zuil en met 1000 ml van dezelfde loopvloeistof geëluëerd. Het vet liep vrijwel gelijk met het front mee. De eerste 400 ml van het eluaat bevatte geen lipide-fosfor. De lecithine-fractie werd verkregen in de volgende 600 ml van de loopvloeistof. De scheiding was niet altijd reproduceerbaar, in die zin dat soms 10 à 15% van de lecithine-fractie bij de sfingomyeline-fractie terecht kwam. De lecithine-fractie werd bij verminderde druk, onder doorleiden van gezuiverde stikstof, gedroogd en opgenomen in tetrachloorkoolstof. De sfingomyeline-fractie werd geëluëerd met 300 ml van een mengsel van methanol-chloroform-water 70 : 25 : 5, en werd, eveneens na droging, opgenomen in tetrachloorkoolstof. Fig. 4 geeft de bijzonderheden van de gevolgde werkwijze weer.

Fig. 4. Scheiding van lecithine, sfingomyeline en vet.

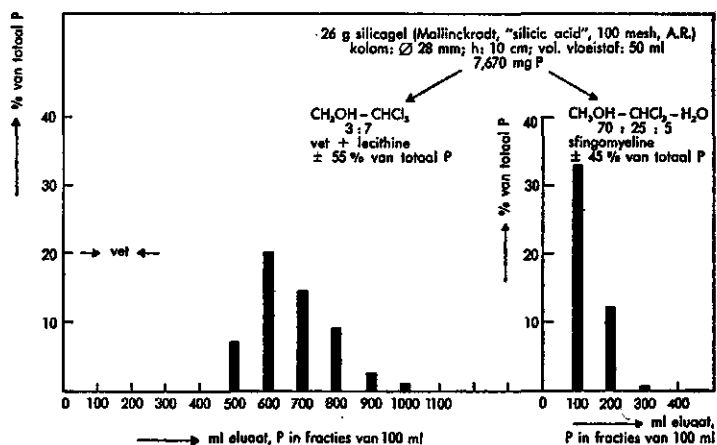


Fig. 4. Separation of lecithin, sphingomyelin and fat.

Fosforbepalingen in de lecithine-, cefaline- en sfingomyeline-fracties wezen uit, dat tijdens de chromatografische procedures ca. 5-10% van de totale hoeveelheid opgebrachte fosfor was verloren gegaan.

## 6. ONVERZADIGDE VETZUREN IN BOTERVET, IN FOSFATIDEN EN IN DE LECITHINE-, CEFALINE- EN SFINGOMYELINE-FRACTIE

### 6.1. Inleiding

De in botervet en fosfatiden voorkomende polyeenzuren vertonen vrijwel geen absorptie in het ultraviolet, daar de betreffende vetzuren bijna alle in een niet-geconjugeerde vorm aanwezig zijn. De niet-geconjugeerde vetzuren gaan tijdens verhitting in een sterk alkalisch milieu gedeeltelijk over in geconjugeerde vorm, waardoor



selectieve absorptie optreedt in het ultraviolet (200–400 m $\mu$ ). De duur van en de temperatuur bij de verhitting moeten constant worden gehouden om reproduceerbare resultaten te verkrijgen. De methode is dus zuiver empirisch. Ze is toepasbaar voor de bepaling van de cis-isomeren van de niet-geconjugeerde polyeenzuren. Indien vetten trans-isomeren bevatten, zoals het geval is bij dierlijke vetten, moeten de resultaten verkregen met de isomerisatietechniek onder voorbehoud worden geïnterpreteerd. De cis-isomeren isomeriseren nl. sneller dan de trans-vormen; het uv-spectrum na isomerisatie is dus afhankelijk van de duur van de verhitting.

SCOTT c.s. (1959) vonden in botervet behalve oliezuur kleine hoeveelheden C<sub>12</sub>–C<sub>16</sub> monoënzuren; de C<sub>12</sub> en C<sub>14</sub> vetzuren kwamen voornamelijk in de cis-vorm, de C<sub>16</sub> en C<sub>18</sub> monoënzuren in de cis- en trans-vorm voor. Geconjugeerde diënzuren waren zowel in de cis-trans- als in de trans-trans-vorm aanwezig. De niet-geconjugeerde diënzuren kwamen voor in de cis-cis-, cis-trans- en trans-trans-vorm. De triëen-, tetraëen- en pentaënzuren hadden alle de cis-cis-configuratie. Verder kan worden opgemerkt dat geconjugeerde triëen- en tetraënzuren niet voldoende zuiver zijn geïsoleerd, zodat het niet mogelijk is exact aan te geven welke invloed isomerisatie heeft op de specifieke extinctiecoëfficiënten.

Alhoewel deze methode dus ongetwijfeld zijn beperkingen heeft, wordt ze veelvuldig toegepast ter karakterisering van de onverzadigde vetzuren in plantaardige en dierlijke vetten. Het is echter de vraag in hoeverre het bepalen van zeer kleine hoeveelheden van bijv. diëen-, triëen-, tetraëen- en pentaënzuren nog enige significante betekenis heeft.

In de laatste jaren is de bepaling van de onverzadigde vetzuren met behulp van de zg. „gas-vloeistof-verdelingschromatografie” sterk op de voorgrond getreden. CRAIG en MURTY (1959) vergeleken de vetzuursamenstelling van niet gehydrogeneerde plantaardige oliën door middel van de gas-vloeistof- en de uv-methode. Voor linolzuur gaf de uv-analyse hogere uitkomsten dan de gas-vloeistof-methode, voor linoleenzuur gold het omgekeerde. KAUFFMAN c.s. (1960) bepaalden, eveneens volgens beide methoden, de vetzuursamenstelling van een aantal dierlijke vetten en plantaardige oliën. Wat betreft het linolzuurgehalte was de overeenstemming tussen beide methoden goed; voor linoleenzuur werden de resultaten van het onderzoek van CRAIG en MURTY bevestigd.

HERB c.s. (1960) daarentegen kwamen tot de conclusie dat beide methoden vrijwel dezelfde resultaten gaven bij de analyse van dierlijke vetten en plantaardige oliën.

INSULL en AHRENS (1959) bepaalden de vetzuursamenstelling van het vet in moedermelk. Ook door hen wordt gerapporteerd dat de uv- en gas-vloeistof-methode dezelfde uitkomsten gaven, hetgeen door SMITH (1961) werd vastgesteld voor koemelk. Het moet echter worden betwijfeld of beide methoden wel tot volkomen gelijke resultaten leiden. De situatie doet zich namelijk voor dat de interpretatie van de pieken, verkregen door middel van de gas-vloeistof-verdelingschromatografie, wordt bemoeilijkt door het feit dat de identiteit van meerdere pieken onbekend is.

BADINGS en KOOPS (1960) bepaalden gaschromatografisch de globale vetzuursamen-

stelling van de fosfatiden uit melk, boter van gezuurde room en karnemelk. Zij stelden vast dat het vetzuurpatroon van de drie genoemde produkten geen wezenlijke verschillen vertoonde.

Uit onderzoekingen van BADINGS (1960) is gebleken dat fosfatiden, in tegenstelling tot botervet, geen vetzuren bevatten met minder dan 12 C-atomen.

## 6.2. Eigen onderzoek

Uit het serum van verse boter werd een gewassen M2-extract bereid; de aceton-precipitatie werd achterwege gelaten. Het extract werd bij verminderde druk geconcentreerd, opgenomen in chloroform-methanol 98 : 2 en onder stikstof bewaard bij  $-40^{\circ}\text{C}$ . Alle handelingen, zowel tijdens de isolatie van de fosfatiden als tijdens de scheiding in fracties en de isomerisatie, werden uitgevoerd onder doorleiden van gezuiverde stikstof.

Voor het verwijderen van het vet uit het fosfatide-extract werd  $2 \times 20$  mg lipide-fosfor opgebracht op twee zuilen van silicagel ( $2 \times 26$  g). Na elutie van de fosfatiden werden de extracten bij elkaar gevoegd en geconcentreerd, waarna opnieuw het gehalte aan lipide-fosfor werd bepaald. Deze hoeveelheid fosfatiden (ca. 1 g) diende voor de bepaling van de geconjugeerde en niet-geconjugeerde vetzuren en het jood-additiegetal.

Voor het isoleren van de fosfatide-fracties werd uitgegaan van 20 mg lipide-fosfor van het ruwe, gewassen M2-extract dat niet met aceton was behandeld. Na de scheiding werd ter controle in alle fracties het fosforgehalte bepaald.

De bepaling van de onverzadigde vetzuren geschiedde overeenkomstig het voorschrift in de "Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Soc." (A.O.C.S. Official Methods Cd 7-58, revised 1959). Het uv-spectrum van de geconjugeerde vetzuren werd gemeten in een oplossing met cyclohexaan (Fluka), dat van de niet-geconjugeerde vetzuren na isomerisatie in een oplossing met gezuiverde methanol. Ethyleenglycol werd gezuiverd volgens het voorschrift van PIKAAR (1957), waarna een oplossing werd bereid die 21 % KOH ( $\pm 0,1\%$ ) bevatte.

Voor het bepalen van de geconjugeerde vetzuren in botervet en in fosfatiden werden resp. ca. 120 en 80 mg (een aliquoot gedeelte van de tetrachloorkoolstofoplossing) opgelost in cyclohexaan, overgebracht in maatkolfjes van 100 ml en werd met hetzelfde oplosmiddel aangevuld tot de streep. Om de extinctie van de dieenzuren te kunnen meten werd van de oplossing van het botervet een verdunning gemaakt van 1 : 1. Het maatkolfje waarin de fosfatiden werden overgebracht, werd leeg en gevuld gewogen en na het meten van het uv-spectrum opnieuw gewogen. Uit deze wegingen werd de resterende hoeveelheid fosfatiden berekend. Sporen trieenzuren, aanwezig in botervet en in fosfatiden, werden verwaarloosd.

Bij de bepaling van de niet-geconjugeerde vetzuren in botervet werd uitgegaan van een hoeveelheid van ca. 200 mg. Voor de fosfatiden bedroeg dit ca. 75 mg. Na isomeri-

satie werd met methanol verdund tot 100 ml. Hiervan werden (zowel van het botervet als van de fosfatiden) verdunningen gemaakt van 1 : 4 (trien- en tetraeenzuren) en 1 : 9 (dieenzuren). De pentaeenzuren werden bepaald in de niet-verdunde oplossingen.

De lecithine-, cefaline- en sfingomyeline-fracties, in hoeveelheden van resp. 50–70, 30–40 en 80–100 mg (aliquote gedeelten van de tetrachloorkoolstofoplossingen) werden eveneens opgelost in cyclohexaan in van te voren gewogen maatkolffjes en verder behandeld als is aangegeven voor de fosfatiden.

Het joodadditiegetal van het botervet en van de fosfatiden werd bepaald volgens de hypochlorietmethode van MUKHERJEE (1955). De monoeezuren (% „oliezuur”) werden berekend uit het verschil tussen het joodgetal en het voor rekening van de hogere onverzadigde vetzuren komend gedeelte van het joodgetal.

Fig. 5. Absorptie in het ultraviolet van melkfosfatiden na alkalische isomerisatie.

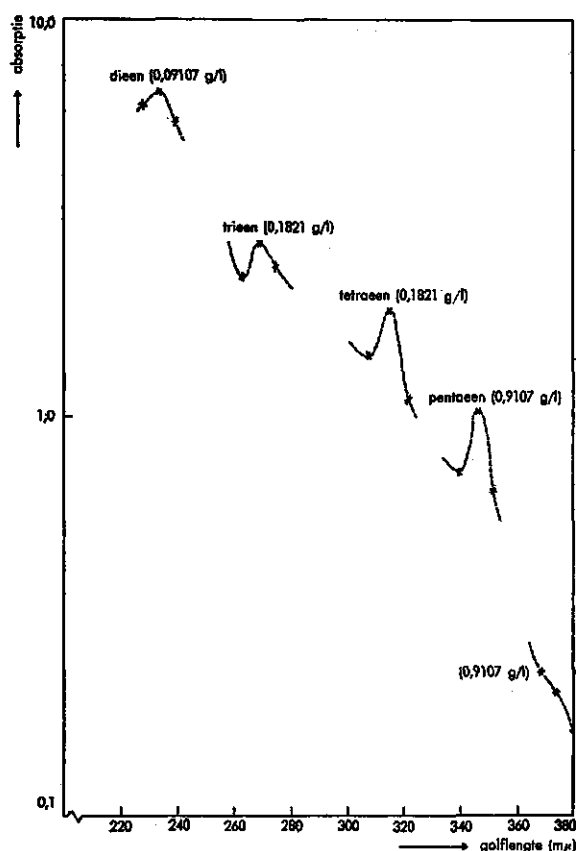


Fig. 5. Ultra-violet absorption of milk phospholipids after alkaline isomerisation.

Fig. 5 toont het uv-spectrum van fosfatiden na alkalische isomerisatie. De spectrale posities van de niet-geconjugeerde absorptiemaxima zijn in overeenstemming met

gegevens betreffende alkali-geïsomriseerde methylesters van linolzuur, linoleenzuur en arachidonzuur (HERB en RIEMENSCHNEIDER, 1952). De pentacen-fractie werd berekend als een mengsel van 50% C<sub>20</sub> en 50% C<sub>22</sub> vetzuren.

In tabel 6 zijn de resultaten van een vijftal experimenten samengevat. Uit deze tabel blijkt duidelijk dat de fosfatiden veel sterker onverzadigd zijn dan de corresponderende triglyceriden. Dit verschil wordt nog geaccentueerd door het feit dat fosfatiden slechts twee en triglyceriden drie vetzuren per molecule bevatten. De resultaten van deze experimenten zijn in overeenstemming met de gegevens van SMITH en JACK (1959).

Over de onverzadigde vetzuren in de fosfatide-fracties is tot nu toe niets bekend.

Fig. 6. De meervoudig onverzadigde vetzuren van botervet, fosfatiden en fosfatide-fracties.

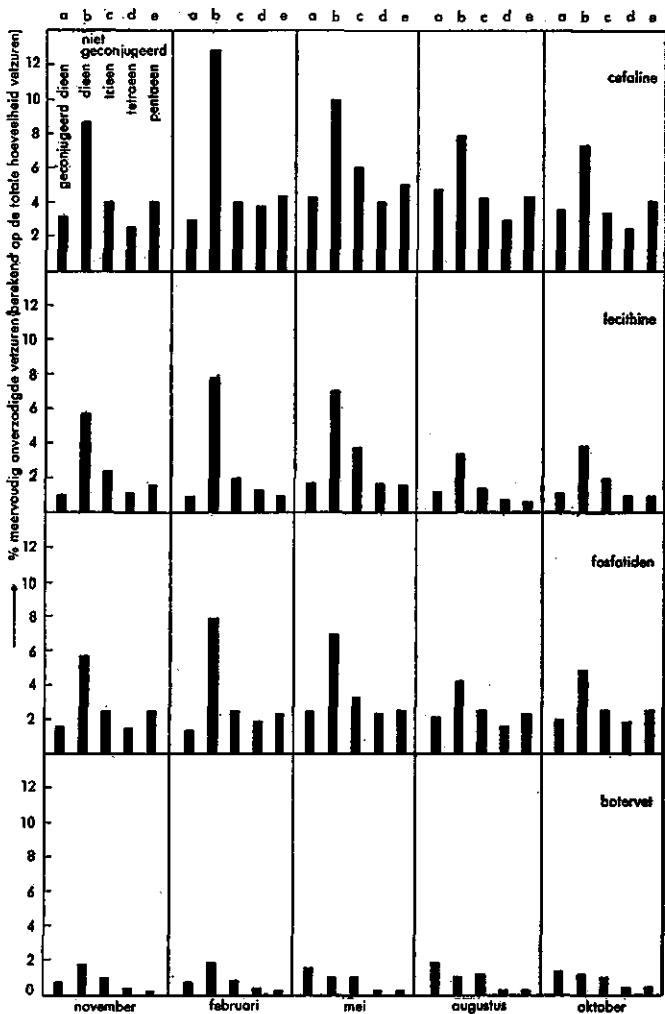


Fig. 6. Poly-unsaturated fatty acids of butter fat, phospholipids and phospholipid fractions.

Tabel 6. Enkel- en meervoudig onverzadigde vetzuren van botervet, fosfatiden en van de fosfatide-fracties (berekend op de totale hoeveelheid lipiden).

Expt. Nr.	Onverzadigde vetzuren	Fosfatiden		Fosfatide-fracties						Onverzadigde vetzuren berekend via de fracties				J-getal fosfatiden		J-getal botervet		Monoeen in fosfatiden		Monoeen in botervet		Botervet	
		Fosfatiden		Lecithine		Cefaline		Sfingomyeline		G		G		G		G		G		G		G	
		G*	NG**	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG
1 20-XI-'58	Dieën	0,98	3,51	0,56	3,81	2,04	5,68	—	—	—	—	1,08	3,69	—	—	—	—	—	—	—	—	0,66	1,61
	Trieën	—	1,68	—	1,57	—	2,62	—	0,73	—	—	—	1,83	—	—	—	—	—	—	—	—	0,76	
	Tetraeën	—	0,97	—	0,75	—	1,73	—	—	—	—	—	1,00	—	—	—	—	—	—	—	—	0,22	
	Pentaeën	—	1,60	—	0,93	—	2,60	—	—	—	—	—	1,44	—	—	—	—	—	—	—	—	0,20	
2 19-II-'59	Dieën	0,89	5,19	0,53	5,26	1,90	8,49	—	—	—	—	1,01	5,40	—	—	—	—	—	—	—	—	0,56	1,79
	Trieën	—	1,69	—	1,38	—	2,65	—	0,97	—	—	—	1,85	54,8	37,2	33,1	32,9	—	—	—	—	0,73	
	Tetraeën	—	1,24	—	0,79	—	2,46	—	—	—	—	—	1,34	—	—	—	—	—	—	—	—	0,21	
	Pentaeën	—	1,49	—	0,65	—	2,82	—	—	—	—	—	1,46	—	—	—	—	—	—	—	—	0,17	
3 11-V-'59	Dieën	1,55	4,55	1,06	4,67	2,81	6,74	—	—	—	—	1,58	4,43	—	—	—	—	—	—	—	—	1,33	0,86
	Trieën	—	2,23	—	2,19	—	3,98	—	—	—	—	—	2,44	57,9	39,4	31,5	34,6	—	—	—	—	1,00	
	Tetraeën	—	1,58	—	0,96	—	2,73	—	—	—	—	—	1,52	—	—	—	—	—	—	—	—	0,21	
	Pentaeën	—	1,79	—	0,92	—	3,27	—	—	—	—	—	1,75	—	—	—	—	—	—	—	—	0,21	
4 10-VIII-'59	Dieën	1,42	2,77	0,68	2,15	3,09	5,18	—	—	—	—	1,60	2,98	—	—	—	—	—	—	—	—	1,63	0,96
	Trieën	—	1,66	—	0,91	—	2,91	—	—	—	—	—	1,58	60,8	42,1	43,8	36,9	—	—	—	—	1,00	
	Tetraeën	—	1,01	—	0,39	—	1,94	—	—	—	—	—	0,99	—	—	—	—	—	—	—	—	0,17	
	Pentaeën	—	1,48	—	0,32	—	2,74	—	—	—	—	—	1,33	—	—	—	—	—	—	—	—	0,22	
5 15-X-'59	Dieën	1,25	3,18	0,70	2,50	2,33	4,90	—	—	—	—	1,25	2,96	—	—	—	—	—	—	—	—	1,17	1,04
	Trieën	—	1,65	—	1,16	—	2,27	—	—	—	—	—	1,37	52,0	35,6	32,3	30,7	—	—	—	—	0,83	
	Tetraeën	—	1,15	—	0,57	—	1,58	—	—	—	—	—	0,88	—	—	—	—	—	—	—	—	0,23	
	Pentaeën	—	1,64	—	0,55	—	2,68	—	—	—	—	—	1,37	—	—	—	—	—	—	—	—	0,29	

\* G = Geconjugeerd

\*\* NG = Niet geconjugeerd

Voor omrekening van de percentages vetzuren op de totale hoeveelheid vetzuren: % in botervet:  $\times 100/91$ % in fosfatiden:  $\times 100/67$ 

Table 6. Mono and poly unsaturated fatty acids of butter fat, phospholipids and of the phospholipid fractions (calculated on the total amount of lipids).

Uit de analyses blijkt dat de groep der cefalinen een veel sterker onverzadigd karakter heeft dan de lecithine-fractie\*. Dit komt vooral tot uiting in de hogere onverzadigde vetzuren. Slechts in enkele gevallen kon in de sfigomyeline-fractie uitsluitend een niet-geconjugeerd trieenzuur worden aangetoond. De overeenstemming tussen de directe analyse in de fosfatiden en de berekende hoeveelheden onverzadigde vetzuren in de fosfatiden via de fosfatide-fracties mag, gezien de onvolkomenheden van deze methode, goed worden genoemd. Daar alle fouten in de experimentele analyse uiteindelijk cumuleren in de berekening van het percentage monoënzuren, mag hieraan niet een te grote nauwkeurigheid worden toegekend.

Gaschromatografisch blijkt de vetzuursamenstelling van de fosfatiden van een vrij gecompliceerd karakter (BADINGS, 1960). De hoeveelheid monoënzuren (voornamelijk oliezuur) is echter uitzonderlijk hoog, hetgeen een nadere interpretatie van het kwantitatieve aspect vergemakkelijkt. Een vergelijkend onderzoek van de resultaten, verkregen uit een door BADINGS (1960) uitgevoerde gaschromatografische analyse en uit de door ons toegepaste alkali-isomerisatietechniek, toonde aan dat het percentage monoënzuren in een monster fosfatiden, geïsoleerd uit verse boter (M3-methode) resp. 47,1 en 49,5% bedroeg (berekend op de vetzuren). De overeenstemming tussen beide methoden mag, althans voor wat betreft de monoënzuren, bevredigend worden genoemd.

In fig. 6 zijn de gegevens van tabel 6 grafisch uitgezet als percentages meervoudig onverzadigde vetzuren, berekend op de totale hoeveelheid vetzuren. Als omrekeningsfactoren voor fosfatiden en botervet werden resp. 100/67 en 100/91 aangehouden (SMITH en JACK, 1959). Uit deze figuur blijkt dat het gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren, zowel van het botervet als van de fosfatiden, in de zomermaanden het hoogst is, uitgezonderd dat van de niet-geconjugeerde dieenzuren, waarvan de top in de winter valt. Het laatstgenoemde verschijnsel was voor botervet reeds door STADHOUDERS en MULDER (1955, 1956) geconstateerd. In overeenstemming hiermede is de variatie in het joodadditiegetal zowel van het botervet als van de fosfatiden vrij aanzienlijk, hetgeen door de resultaten in fig. 7 duidelijk wordt geïllustreerd. Deze gegevens hebben betrekking op botervet en fosfatiden van zoete boter, die werd bereid uit room van gemengde melk in de NIZO-proeffabriek. Alhoewel de seizoenvariatie in het gehalte aan onverzadigde vetzuren van botervet en fosfatiden hetzelfde beeld vertoont, zijn de fosfatiden veel sterker onverzadigd dan het botervet. Dit impliceert in beginsel dat ook de gevoeligheid voor oxidatie van de fosfatiden groter is dan die van het botervet, hetgeen speciaal geldt voor de cefaline-fractie die het sterkst onverzadigd is. Tabel 7 demonstreert het verschil in gehalte aan onverzadigde vetzuren van de cefaline-fractie en van het botervet. In hoofdstuk III komen wij hierop nog nader terug in verband met de oxidatiesnelheid van het botervet, de fosfatiden en de fosfatide-fracties.

\* Na het afsluiten van dit proefschrift verscheen een publikatie van SMITH en LOWRY (1962) over de onverzadigde vetzuren van de fosfatide-fracties (GLC-methode), waarin eveneens naar voren komt dat de groep der cefalinen het sterkst onverzadigd is. Ook BADINGS (1962) kwam tot deze conclusie.

Fig. 7. De invloed van het jaargetijde op het joodadditiegetal van botervet en van fosfatiden.

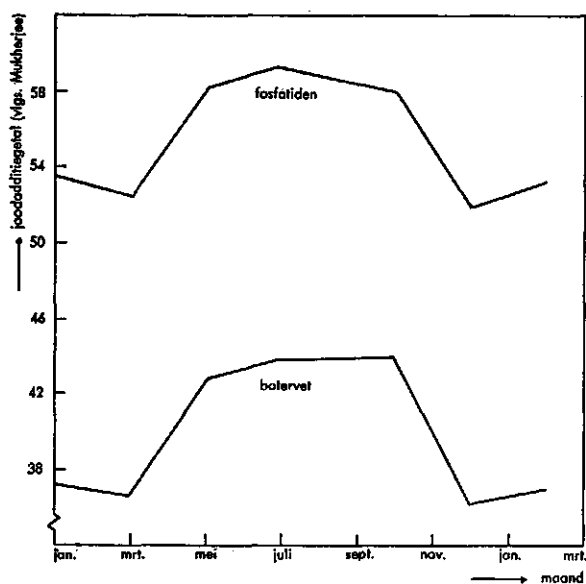


Fig. 7. Seasonal variation in the iodine addition number of butter fat and of phospholipids.

Tabel 7. Het gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren van cefaline en van botervet (berekend op de totale hoeveelheid vetzuren).

		Cefaline-fractie		Botervet	
		Max.	Min.	Max.	Min.
		%	%	%	%
Geconjugeerd Dieen		4,64	2,85	1,79	0,62
Niet-geconjugeerd	Dieen	12,74	7,35	1,97	0,95
	Trieen	5,97	3,41	1,10	0,80
	Tetraeen	4,10	2,37	0,25	0,19
	Pentaen	4,91	3,90	0,32	0,19

Table 7. The content of poly unsaturated fatty acids of cephalin and of butter fat (calculated on the total amount of fatty acids).

## OXIDATIE VAN FOSFATIDEN EN VAN BOTERVET

## 1. INLEIDING

Verschillende onderzoekers gingen de gevoeligheid van fosfatide-solen voor oxidatie na door de zuurstofopneming te bepalen. Deze experimenten werden voornamelijk verricht met fosfatiden uit weefsels, eieren en sojabonen.

DEUTSCH c.s. (1941) bepaalden de zuurstofopneming van fosfatiden bereid uit levers van ratten. Toevoeging van koperionen en ascorbinezuur aan een fosfatide-sol ( $\text{pH} \pm 4,0$ ) verhoogde de oxidatiesnelheid. Het joodgetal van de fosfatiden daalde sterk, hetgeen duidt op oxidatie van de onverzadigde vetzuren van de fosfatiden. Het fosfatide-molecule zou hierbij intact blijven, daar geen anorganisch fosfaat kon worden aangetoond.

BERNHEIM c.s. (1948) stelden vast dat zowel lecithine (uit eieren) als cefaline (uit weefsel) snel oxideerden. De thiobarbituurzuur-waarde nam snel toe, terwijl het joodgetal daalde. De toeneming van eerstgenoemde waarde werd veroorzaakt door oxidatieproducten van onverzadigde vetzuren van de fosfatiden (voornamelijk linol-, linoleen- en arachidonzuur; TARLADGIS en WATTS, 1960). Sfingomyeline daarentegen was stabiel ten opzichte van zuurstof.

PAGE en BÜLOW (1935) isoleerden cefaline (uit hersenweefsel) en lecithine (uit eieren). Cefaline bleek veel gevoeliger voor zuurstof dan lecithine; ijzerionen deden de zuurstofabsorptie veel sterker toenemen dan koperionen.

YOUNATHAN en WATTS (1960) constateerden dat de in „cooked meats” optredende oxidatie voornamelijk werd veroorzaakt door de in dit produkt aanwezige fosfatiden.

Uit onderzoeken van RADSMA en VAN GRONINGEN (1959) is gebleken dat ascorbinezuur + lactaat de oxidatie van fosfatiden, geïsoleerd uit de levers van ratten, sterk bevordert. Een vergelijking tussen de uv-spectra van niet-geoxideerde en geoxideerde fosfatiden toonde aan dat na oxidatie de absorptie bij 235 en 270  $\text{m}\mu$  sterk was verhoogd, hetgeen werd veroorzaakt door conjugatie van dubbele bindingen in de onverzadigde vetzuren. Zeer interessant was de waarneming dat de choline-bevattende fosfatiden (lecithine en sfingomyeline) geen zuurstofabsorptie vertoonden en dat dit wel het geval was voor de groep der cefalinen (fosfatidylethanolamine, -serine en -inositol).

Onderzoeken betreffende het gedrag van melkfosfatiden zijn echter betrekkelijk schaars.

HARTMANN (1947) stelde vast dat melkfosfatiden onder invloed van koperionen zeer snel zuurstof opnemen. Verbindingen die koper binden, zoals bijv. natrium-diethyldithiocarbamaat, remmen de zuurstofabsorptie volledig.



STULL c.s. (1951) kwamen bij hun onderzoek naar de invloed van nordihydroguajareetzuur op de zuurstofabsorptie van fosfatiden, tot dezelfde conclusie als HARTMANN. Koperionen zouden een grotere invloed hebben op de oxidatie dan nikkel-, ijzer- en cobaltionen. Bij verlaging van de pH (6,0→3,0) verliep de oxidatie sneller.

SWARTLING en MATSSON (1956) constateerden dat de snelheid waarmee een gebufferde emulsie van methyllinoleaat oxideert, toeneemt naarmate de pH wordt verhoogd; het omgekeerde is het geval indien fosfatiden aanwezig zijn. Het verband tussen de pH van de waterfase en de gevoeligheid voor oxidatie van onverzadigde vetzuuresters, in aanwezigheid van fosfatiden en koperionen, was dus hetzelfde als bij boter, hetgeen de invloed van de fosfatiden duidelijk aantoonde.

Verschillende onderzoekers namen waar dat het joodadditiegetal van het melkvet daalde na toevoeging van koper aan de melk en dat gelijktijdig een oxidatiesmaak optrad (KENDE, 1932; DAHLE en PALMER, 1937; KRUKOVSKY, 1952). Uit de resultaten van anderen blijkt echter dat het joodgetal van het vet onder die omstandigheden niet verandert (HENDERSON en ROADHOUSE, 1934; BROWN c.s., 1937, 1941; CORBET en TRACY, 1943).

SWANSON en SOMMER (1940) onderzochten in hoeverre veranderingen optraden in de joodadditiegetallen van het botervet en van de fosfatiden in melk met een oxidatiesmaak. Indien zij koper toevoegden aan melk namen zij na enkele dagen een daling van het joodadditiegetal van de fosfatiden waar; dat van het vet was constant gebleven. De door koper geïnduceerde oxidatiesmaak zou dus in eerste instantie een gevolg kunnen zijn van oxidatie van de fosfatiden.

Indien een geoxideerd fosfatide-sol werd toegevoegd aan melk kon een typische oxidatiesmaak worden waargenomen (THURSTON c.s., 1935; JOSEPHSON en DOAN, 1939; RIEL, 1952).

Uit deze onderzoeken kan eveneens de conclusie worden getrokken dat de fosfatiden vermoedelijk ten nauwste zijn betrokken bij het ontstaan van oxidatieve smaakgebreken in melk en in de hieruit bereide produkten.

Het leek daarom wenselijk aan dit aspect nader aandacht te besteden.

## 2. DE INVLOED VAN KOPER OP HET JOODADDITIEGETAL VAN DE FOSFATIDEN EN VAN HET VET

### 2.1. Werkwijze

Een hoeveelheid van 50 kg melk werd met behulp van een handcentrifuge ontroomd. De room werd na pasteurisatie (63°C, 30 min) in drie porties verdeeld. Bij één portie room werd direct het joodadditiegetal van het vet en van de fosfatiden bepaald (methode Wijs N 1046-50), van de twee andere porties geschiedde dit na 3, c.q. 8 dagen bewaring bij een temperatuur van 3°C. Aan één van de twee porties werd koper toegevoegd. Om het vet te kunnen afscheiden werd de room gekarnd; uit de

verkregen boter werden de fosfatiden geïsoleerd volgens de M1-methode. Details van de gevolgde werkwijze zijn reeds eerder beschreven (KOOFS, 1957).

## 2.2. Resultaten

Tabel 8 geeft de resultaten van een drietal proeven weer. In de door SWANSON en SOMMER beschreven experimenten daalden de joodadditiegetallen van de fosfatiden,

Tabel 8. De invloed van koper op het joodadditiegetal van het vet en van de fosfatiden van room.

Expt. nr.	Joodadditiegetal	
	Vet	Fosfatiden
1		
Room (blanco)	45,0	60,0
Room (blanco) na drie dagen	44,9	57,8
Room + 5 ppm koper na drie dagen	45,6	48,2
2		
Room (blanco)	41,7	55,6
Room (blanco) na acht dagen	41,5	49,8
Room + 5 ppm koper na acht dagen	41,3	45,4
3		
Room (blanco)	40,8	51,8
Room (blanco) na acht dagen	40,8	48,1
Room + 5 ppm koper na acht dagen	40,8	47,5
Room + 50 ppm koper na acht dagen	40,8	42,7

Table 8. *The influence of copper on the iodine addition number of fat and of phospholipids from cream.*

na toevoeging van 3 ppm koper aan de melk, van resp. 60,3 en 48,7 tot resp. 33,5 en 33,7. In geen van de in tabel 8 weergegeven resultaten kon een dergelijke aanzienlijke daling worden bereikt, zelfs niet bij een koperdosering die veel hoger was dan die door de genoemde auteurs werd toegepast. De veronderstelling van SWANSON en SOMMER, dat de oxidatie van de fosfatiden voortschrijdt tot een joodadditiegetal van  $\pm 32$  is bereikt (waarbij het oliezuur niet wordt geoxideerd), lijkt zeer onwaarschijnlijk. Hoewel de snelheid waarmee onverzadigde vetzuren oxideren afhankelijk is van hun onverzadigdheid, moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid dat ook het oliezuur bij aanwezigheid van hogere onverzadigde vetzuren minder stabiel is. Zo vonden GUNSTONE en HILDITCH (1946) dat in aanwezigheid van 1 % methyllinoleaat de inductieperiode van methyloleaat (bij 20°C) wordt verkleind; de autoxidatiesnelheid nam aanmerkelijk toe.

Wat betreft de oorzaak van de verlaging van het joodadditiegetal van de fosfatiden, tasten wij echter nog grotendeels in het duister. Bij lage bewaartemperaturen zouden

bijna uitsluitend hydroperoxiden worden gevormd waarbij de dubbele band behouden blijft. Indien cyclische peroxiden zouden worden gevormd (waarbij de dubbele band verdwijnt) zou men inderdaad een verlaging van het joodadditiegetal kunnen verwachten. Dat desondanks het joodadditiegetal een daling vertoont, zou ten eerste zijn oorzaak kunnen vinden in het feit dat door autoxidatie van de meervoudig onverzadigde vetzuren conjugatie optreedt (BERGSTRÖM, 1945; CANNON c.s., 1952; PRIVETT c.s., 1953), waardoor halogenen moeilijker worden geaddeerd. Ten tweede moet worden gewezen op het feit dat de bepaling van het joodadditiegetal in aanwezigheid van geoxideerde vetten een te lage waarde geeft, mogelijk ten gevolge van „sterische hindering” in de halogeenadditie (HOLMAN c.s., 1954). Verder moet worden opgemerkt dat tijdens oxidatie van onverzadigde vetzuren polymeren kunnen worden gevormd (CHANG en KUMMEROW, 1953 (linolzuur); WITTING c.s., 1957 (linoleenzuur); FAULKNER, 1958 (methylelaeostearaat)) waardoor de dubbele banden, althans gedeeltelijk, verdwijnen (FUGGER c.s., 1951). Tenslotte moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid, dat behalve hydroperoxiden wellicht ook peroxiden van een cyclische structuur ontstaan (WILLITS c.s., 1952; SWERN en COLEMAN, 1955), hetgeen dus eveneens aanleiding zou kunnen geven tot een verlaging van het joodadditiegetal van de fosfatiden.

Het is echter duidelijk dat de daling die optreedt in het joodadditiegetal van de fosfatiden doet veronderstellen, dat het oxidatieproces in room zich in eerste instantie zal afspelen aan het grensvlak vet/water.

### 3. ORGANOLEPTISCHE PROEVEN MET GEOXIDEERDE FOSFATIDE-SOLEN

Het onder 2 uitgevoerde experiment gaf aanleiding om nader te onderzoeken in hoeverre geoxideerde fosfatiden smaakafwijkingen kunnen veroorzaken die overeenkomen met de smaakgebreken die in koelhuisboter kunnen worden waargenomen. Daartoe werden uit boter fosfatiden geïsoleerd (M1-methode) en gedispergeerd in een fosfaat-citraat buffer (pH 4,6). Aan 1900 mg fosfatiden werden resp. 500 ml buffer en 24 mg koper (als kopersulfaat) toegevoegd, waarna gedurende 3 dagen in het donker werd geschud bij een temperatuur van 12°C. Indien 1 ml van het geoxideerd fosfatide-sol werd gemengd met 10 ml verse melk kon een duidelijke oxidatiesmaak worden waargenomen, hetgeen in overeenstemming is met de resultaten van de in de inleiding vermelde auteurs.

Volgens PONT (1953b) worden de verbindingen die in ondermelk oxidatiesmaak veroorzaken snel door vetbolletjes geabsorbeerd indien aan de ondermelk room wordt toegevoegd. Naar analogie hiervan werd aan het geoxideerd fosfatide-sol vers, vloeibaar botervet toegevoegd, waarna gedurende 1 min krachtig werd geschud. Het afgecentrifugeerde vet had een tranig-talkige smaak.

Bij het volgende experiment werden fosfatiden (M1-methode) in een koperbevattende buffer (pH 4,6) gedispergeerd, in een concentratie overeenkomend met die in boter-

serum (1 kg boter bevat ca. 160 ml serum, waarin 1,5–2 g fosfatiden aanwezig zijn). Ter vergelijking werd eveneens botervet met behulp van arabische gom geëmulgeerd in een buffer van dezelfde pH (tabel 9). De monsters werden in het donker bij 2°C

Tabel 9. Organoleptische keuringsresultaten van vers botervet dat in contact is geweest met de fosfatide-solen A en B en de emulsie C (pH 4,6).

Bewaartijd in dagen bij 2–4°C	Smaak van het verse vet na contact met		
	A	B	C
	160 ml buffer 1,6 g fosfatiden 1000 µg koper	160 ml buffer 1,9 g fosfatiden 500 µg koper	160 ml buffer 2 g botervet 1000 µg koper
8	iets vettig	normaal	normaal
18	vettig	iets vettig	normaal
27	tranig	iets vettig	normaal
40	sterk tranig	tranig	normaal
53	talkig	talkig	normaal
60	talkig	talkig	normaal

Table 9. Organoleptic scores of fresh butter fat which has been in contact with the phospholipid sols A and B and with emulsion C (pH 4,6).

bewaard en af en toe gedurende een half uur krachtig geschud. Regelmatig werden monsters van 20 ml afgepipetteerd en gemengd met vers vloeibaar botervet. Daarna werd het vet onmiddellijk afgecentrifugeerd en organoleptisch beoordeeld. Blijkens de gegevens uit de tabel worden fosfatiden snel geoxideerd, waarbij smaakafwijkingen optreden die zeer sterk doen denken aan het smaakverloop van slecht houdbare koel-huisboter. De emulsie van het botervet vertoonde geen smaakafwijkingen.

Het experiment werd op de in tabel 10 aangegeven wijze herhaald, waarbij tevens natriumchloride werd toegevoegd (gezouten boter). Slechts de solen A en B gaven na verloop van tijd aan vers botervet een tranige smaak, de emulsie van botervet daarentegen niet. Van enige invloed van natriumchloride op de tranige smaak was geen sprake.

In een vierde experiment werd het verband nagegaan tussen de zuurstofabsorptie van fosfatide-solen en de intensiteit van de smaakafwijking. De zuurstofabsorptie werd bepaald door middel van de conventionele Warburg-methode, de „reactie-vaatjes” hadden een inhoud van ca. 300 ml. Uit  $\pm 5$  kg boter werden de fosfatiden geïsoleerd (M2-methode), waarna 8 g van het gereinigde, in vacuüm gedroogde preparaat werd gedispergeerd in 640 ml kaliumbifthalaat-natriumhydroxide buffer (pH 4,6). Het fosfatide-sol werd verdeeld over 4 Warburg-vaatjes, waarna koper ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) c.q. ijzer ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ ) werd toegevoegd. De schudtemperatuur bedroeg 1°C, de vaatjes werden niet blootgesteld aan lichtinwerking. Er werd alleen overdag geschud. Ter karakterisering van de smaakafwijkingen werd telkens

Tabel 10. Organoleptische keuringsresultaten van vers botervet dat in contact is geweest met de fosfatide-solen A en B en de emulsie C (pH 4,6).

	Smaak van het verse vet na contact met		
	A	B	C
Bewaartijd in dagen bij 2-4°C	160 ml buffer 2,6 g fosfatiden 1500 µg koper 15 g natrium- chloride	160 ml buffer 2,6 g fosfatiden 20 g botervet 1500 µg koper 15 g natrium- chloride	160 ml buffer 20 g botervet 1500 µg koper 15 g natrium- chloride
5	iets vettig	iets vettig	normaal
10	vettig	vettig	normaal
15	licht tranig	licht tranig	normaal
20	tranig-talkig	tranig-talkig	normaal

Table 10. *Organoleptic scores of fresh butter fat which has been in contact with the phospholipid sols A and B and with emulsion C (pH 4,6).*

20 ml van de resp. fosfatide-solen geschud met 25 g vers botervet, waarna het vet werd afgecentrifugeerd en organoleptisch beoordeeld. De bacteriologische gesteldheid van de fosfatide-solen werd gecontroleerd door zowel aan het begin als aan het eind van het experiment de kiemgetallen te bepalen. De zuurstofabsorptie werd in alle gevallen berekend per 2 gram fosfatiden. Bijzonderheden en resultaten van dit experiment zijn samengevat in tabel 11.

Uit de in deze tabel verzamelde gegevens blijkt dat de oxidatie van fosfatide-solen door driewaardige ijzerionen veel sterker wordt bevorderd dan door koperionen. MULDER c.s. (1949) stelden echter vast dat ijzerionen geen invloed uitoefenen op de houdbaarheid van koelhuisboter. Blijkbaar is dit eenvoudige systeem niet representatief voor dat van boter, in die zin dat de katalytische invloed van ijzerionen in boter op de een of andere wijze zal worden te niet gedaan en dat dit voor koperionen niet het geval is.

De intensiteit van de smaakafwijking nam toe van vettig, via tranig naar vissig (nr. 4, na 20 dagen). Tranigheid trad op bij een zuurstofabsorptie van ca. 1,8 ml O<sub>2</sub>/2 g fosfatiden. Het is echter zeer de vraag of dit gegeven zonder meer mag worden overgedragen op boter. De uit de onverzadigde vetzuren van de fosfatiden gevormde carbonylverbindingen zullen in boter diffunderen in de vetfase, waar ze worden beschermd tegen verdere oxidatie. In fosfatide-solen daarentegen zijn de gevormde carbonylverbindingen direct blootgesteld aan verdere oxidatieve afbraak. Dit impliceert dat de hoeveelheid zuurstof die nodig is om in boter tranigheid te doen ontstaan wellicht véél geringer is.

Tenslotte werd in een oriënterend experiment de invloed van ijzerionen in combinatie met ondermelk nagegaan. Daartoe werden op dezelfde wijze als in de vorige proef is beschreven, de volgende solen bereid: 2 g fosfatiden in 160 ml buffer (pH

Tabel 11. Het verband tussen de organoleptische beoordeling van vers botervet dat in contact is geweest met geoxideerde fosfatide-solen en de zuurstof-absorptie van de fosfatiden (pH 4,6).

Na dagen bij 1°C	1		2		3		4	
	2 g fosfatiden 160 ml buffer		2 g fosfatiden 160 ml buffer 25 µg koper		2 g fosfatiden 160 ml buffer 50 µg koper		2 g fosfatiden 160 ml buffer 50 µg ijzer	
	Zuurstof- absorptie	Smaak van het verse vet	Zuurstof- absorptie	Smaak van het verse vet	Zuurstof- absorptie	Smaak van het verse vet	Zuurstof- absorptie	Smaak van het verse vet
	mm <sup>3</sup> /2 g		mm <sup>3</sup> /2 g		mm <sup>3</sup> /2 g		mm <sup>3</sup> /2 g	
0	—	normaal	—	normaal	—	normaal	—	normaal
3	315	normaal	437	normaal	458	normaal	567	normaal
5	568	normaal	967	licht vettig	983	licht vettig	1800	sterk vettig- licht tranig
14	1197	vettig	1510	sterk vettig	1773	licht tranig	4421	tranig
18	1233	olieachtig	1714	licht tranig	2001	tranig	6709	sterk tranig
20	1481	sterk vettig	2186	tranig	2543	tranig	8248	sterk tranig- vissig
27	1840	licht tranig	3417	tranig	4764	tranig	13112	sterk tranig
Aantal kiemen/ml	< 10		< 10		< 10		< 10	
Begin	< 10		< 10		< 10		< 10	

Tabel 11. Relation between the organoleptic score of fresh butter fat which has been in contact with oxidized phospholipid sols and the oxygen consumption of the phospholipids (pH 4,6).

4,55); 2 g fosfatiden in 160 ml buffer met 50  $\mu$ g koper; 2 g fosfatiden in 160 ml buffer met 50  $\mu$ g ijzer en 2 g fosfatiden in 160 ml buffer met 50  $\mu$ g ijzer in 25 ml gepasteuriseerde ondermelk. De ondermelk werd met 1 N  $H_2SO_4$  aangezuurd tot pH 4,55 en vervolgens toegevoegd. Na 10 dagen bedroeg de zuurstofabsorptie resp. 991, 1568, 2885 en 273  $mm^3/2$  g fosfatiden. De bacteriologische gesteldheid van de monsters veranderde gedurende deze 10 dagen vrijwel niet. Hoewel een blanco bestaande uit fosfatiden in buffer en ondermelk ontbreekt, ligt het vermoeden voor de hand dat ondermelk o.a. in staat is ijzerionen te inactiveren. Wij komen hierop nader terug onder 4.2.

#### 4. DE ZUURSTOFABSORPTIE VAN BOTERVET, FOSFATIDEN EN FOSFATIDE-FRACTIES. FACTOREN DIE HIEROP INVLOED UITOEFENEN

##### 4.1. Botervet

Uit verse, olieachtige en tranige boter werd het botervet afgescheiden, waarna 300 mg van elk van de botervetten werd gemengd met 200 mg hydrofobe silicagel. N-silicagel werd daartoe hydrofoob gemaakt met behulp van dimethyldichloorsilaan volgens de methode van VAN DUIN (1961a). Vervolgens werd aan de mengsels 4 ml bifthalaat-natriumhydroxide buffer (pH  $\pm$  4,6, 0,05M) toegevoegd.

Met behulp van de Warburg-methode (inhoud vaatjes  $\pm$  15 ml) werd in duplo de zuurstofabsorptie nagegaan bij een temperatuur van 37°C. Uit fig. 8 blijkt dat de

Fig. 8. De zuurstofabsorptie van resp. vers, olieachtig en tranig botervet.

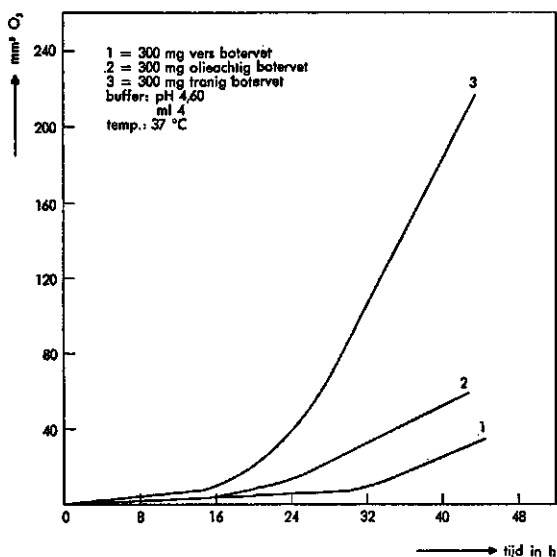


Fig. 8. The oxygen consumption of fresh, oily and trainy butter fat.

zuurstofabsorptie van de drie soorten botervet aanvankelijk niet veel verschilt. Ook voor het olieachtige, c.q. tranige vet is de inductieperiode kennelijk nog niet beëindigd. Na ca. 16 h schudden vertoonde het tranige vet een sterke toeneming in zuurstofabsorptie, die na resp. 20 en 30 h eveneens optrad in het olieachtige en het verse vet. De inductieperiode van het tranige vet was dus aanmerkelijk korter dan die van het verse vet.

Zoals reeds eerder is opgemerkt neemt TOLLENAAR aan, dat tranigheid in boter ontstaat door oxidatie van lipiden in het grensvlak vet/serum. Hierbij zou een gekoppelde oxidatie optreden met het botervet, waarbij in het vet diffunderende hydroperoxiden, afkomstig van lipiden in het grensvlak, de vetoxidatie initiëren. De accumulatie van hydroperoxiden in het botervet van olieachtige, c.q. tranige boter zou dan verder zijn voortgeschreden dan in dat van verse boter, echter zonder dat daarbij de inductieperiode van de betreffende vetten is overschreden.

Het meten van de stabiliteit van botervet (inductieperiode) ter verkrijging van een indicatie omtrent de gevoeligheid van boter voor het ontstaan van tranigheid heeft weinig waarde, daar tussen de houdbaarheid van boter en de stabiliteit van het botervet geen verband kan worden gelegd. De experimenten die werden uitgevoerd

Fig. 9. De invloed van koper op de zuurstofabsorptie van respectievelijk vers, vettig en tranig botervet.

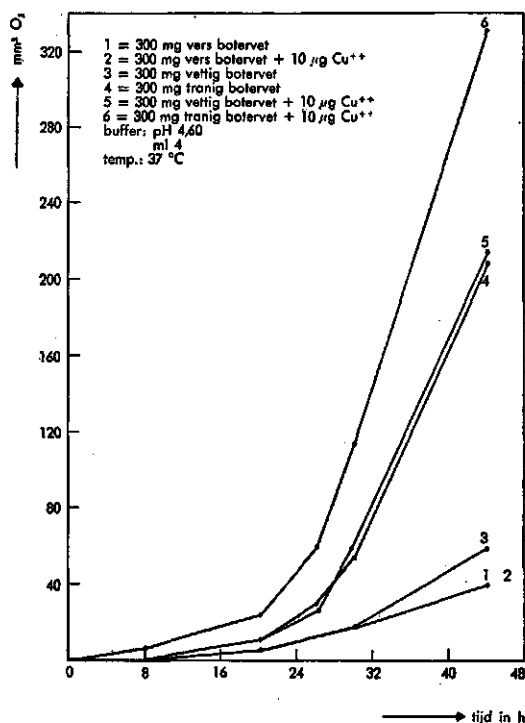


Fig. 9. The effect of copper on the oxygen consumption of fresh, fatty and trainy butter fat.



met botervet hadden daarom uitsluitend ten doel onder verschillende proefomstandigheden de gevoeligheid voor oxidatie te vergelijken met die van fosfatide-solen.

In fig. 9 zijn de resultaten van een experiment weergegeven, waarbij, behalve de verschillende vetten, koperionen aan de buffer werden toegevoegd (in de vorm van  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). De oxidatie van het verse botervet wordt door toevoeging van koperionen niet versneld. Dit is wel het geval bij het fettige en het tranige botervet. In het verse botervet zijn, in tegenstelling tot het fettige en tranige botervet, klaarblijkelijk nog zó weinig hydroperoxiden aanwezig, dat de door koper gekatalyseerde reactie in dit korte tijdsbestek niet tot uiting komt in een versnelde zuurstofabsorptie. Na  $\pm$  45 h vertoont ook het verse vet onder invloed van koperionen een stijging in de zuurstofabsorptie (fig. 10).

BAWN c.s. (1951) en BAWN (1953) nemen aan dat metaalionen, zoals die van koper, indirect bijdragen tot de vorming van vrije radicalen, daar deze ionen de ontleding van de gevormde hydroperoxiden versnellen.

Fig. 10. De invloed van koper en ijzer, al of niet in combinatie met eiwit, op de zuurstofabsorptie van botervet.

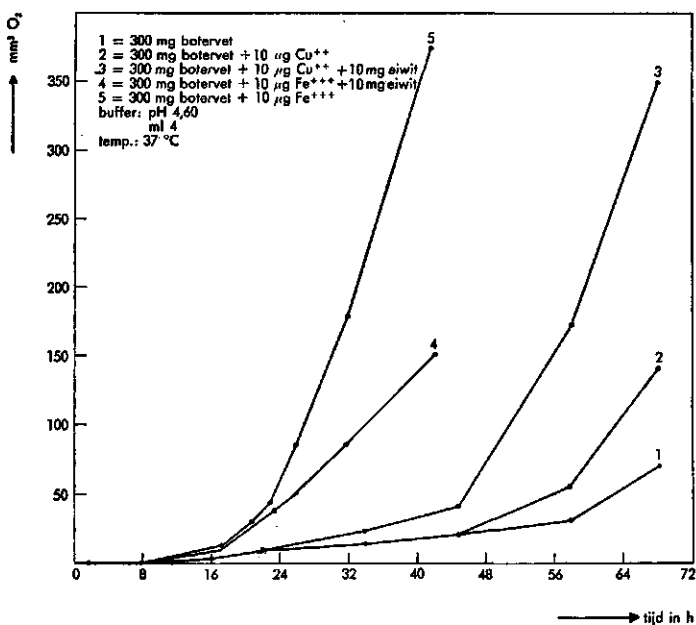


Fig. 10. The influence of copper and iron, with and without combination with protein, on the oxygen consumption of butter fat.

Indien aan dit systeem behalve koperionen eveneens uit boterserum geïsoleerd eiwit wordt toegevoegd, wordt de zuurstofabsorptie van het botervet veel sterker versneld dan door koper alleen (fig. 10). Een dergelijk verschijnsel werd door TAPPEL (1955) waargenomen bij de bestudering van de invloed van koper-eiwitverbindingen

op de oxidatie van ammoniumlinoleaat. De toeneming van de zuurstofabsorptie onder invloed van koper-eiwitverbindingen zou volgens deze auteur moeten worden toegeschreven aan het feit, dat de vorming, resp. de stabiliteit van het intermediaire complex van linoleaatperoxide-koper-eiwitverbinding gemakkelijk tot stand komt, resp. vergroot zou zijn.

In tegenstelling met de opvatting van BAWN neemt GREENAWALD (1954) aan dat koper geen valentiewisseling ondergaat tijdens de katalytische ontleding van de hydroperoxiden. TAPPEL (1953) veronderstelt dat koper-eiwitcomplexen in die zin overeenkomst vertonen met ijzer-porfyrineverbindingen.

Ijzerionen blijken een veel grotere invloed te hebben op de zuurstofabsorptie van het botervet dan koperionen (fig. 10). De inductieperiode wordt aanmerkelijk verkort; reeds na ca. 16 h vindt een snelle zuurstofabsorptie plaats. Eiwit blijkt in dit systeem remmend te werken. De zuurstofabsorptie is bij een eiwit/ijzerverhouding van 1000 na 40 h schudden tot op 2/5 van de oorspronkelijke hoeveelheid teruggebracht. Indien aan dit systeem een zodanige hoeveelheid eiwit wordt toegevoegd dat alle ijzerionen zijn gebonden, wordt de zuurstofabsorptie geheel teruggebracht tot het oorspronkelijke niveau. In boter is de eiwit/ijzer verhouding ca. 30 maal groter dan in voornoemd experiment. Vrije ijzerionen komen in dit milieu zeer waarschijnlijk niet voor. Hierop zal onder 4.2. nader worden teruggekomen.

Fig. 11. De zuurstofabsorptie van respectievelijk botervet en fosfatiden, met en zonder toevoeging van koper.

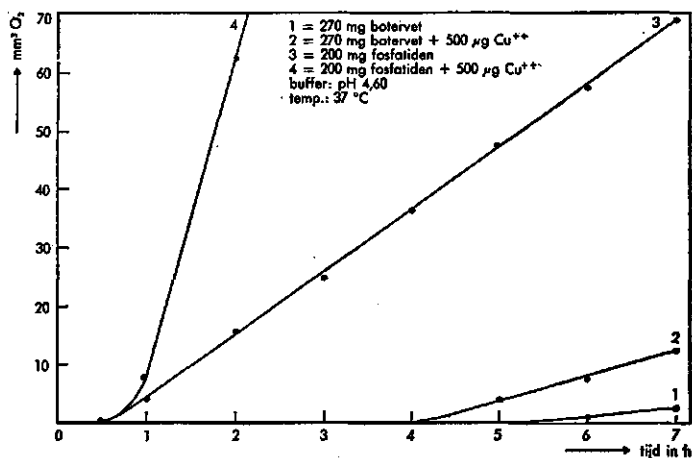


Fig. 11. The oxygen consumption of butter fat and phospholipids, with and without added copper.

Tenslotte is in fig. 11 een vergelijking getroffen tussen de zuurstofabsorptie van fosfatiden (M1-methode) uit boter en het uit deze boter geïsoleerde botervet. De fosfatiden werden gedispergeerd in een bifthalaat-natriumhydroxide buffer (pH 4,6; 0,05M; 200 mg/4 ml), het botervet werd met behulp van arabische gom in emulsie-

vorm gebracht (270 mg/5 ml). Na 7 h schudden in het Warburg-apparaat had 270 mg botervet ca. 2 mm<sup>3</sup> zuurstof opgenomen; voor 200 mg fosfatiden bedroeg dit 69 mm<sup>3</sup>. De gevoeligheid van de fosfatiden voor oxidatie is dus beduidend groter dan die van het botervet, hetgeen na toevoeging van koper nog wordt geaccentueerd.

## 4.2. Fosfatiden

Fig. 12 geeft een beeld van de invloed van de pH op de zuurstofabsorptie van fosfatiden. Uit boter geïsoleerde fosfatiden (M1-methode) werden gedispergeerd in buffers

Fig. 12. De invloed van de pH op de zuurstofabsorptie van fosfatiden.

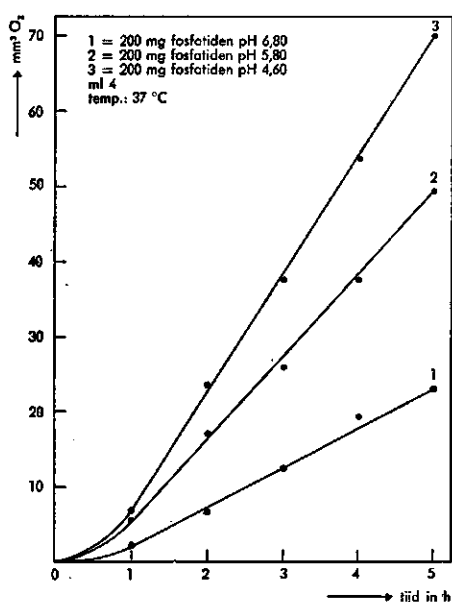


Fig. 12. The influence of pH on the oxygen consumption of phospholipids.

(0,05M) met een pH van resp. 6,80 (primair kaliumfosfaat-natriumhydroxide), 5,80 (id.) en 4,60 (kaliumbifthalaat-natriumhydroxide). Bij verlaging van de pH blijkt de oxidatie van de fosfatiden sneller te verlopen. Volgens SWARTLING en MATTSSON (1956) verloopt de oxidatie van methylesters van onverzadigde vetzuren echter sneller naarmate de pH hoger is. Daar boter gevoeliger is voor oxidatie naarmate de pH wordt verlaagd, beschouwen SWARTLING en MATTSSON de fosfatiden als omvormers van de pH-afhankelijkheid van de vetzuuroxidatie.

In overeenstemming met deze hypothese werd door hen geconstateerd dat, na toevoeging van fosfatiden aan methylolinoleaat, de oxidatie van de vetzuurester bij pH 4,6 sneller verloopt dan bij pH 6,8; voor pH 8,3 werden intermediaire waarden

gevonden. De door genoemde onderzoekers gestelde hypothese is echter niet zonder meer aanvaardbaar, daar experimenten met uitsluitend fosfatiden ontbreken.

Fig. 13. De invloed van verschillende hoeveelheden koper op de zuurstofabsorptie van fosfatiden.

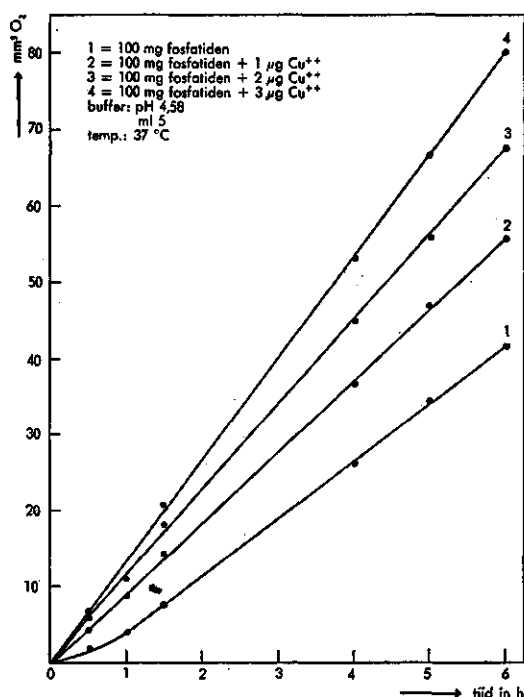


Fig. 13. The influence of various amounts of copper on the oxygen consumption of phospholipids.

Fig. 13 illustreert de invloed van kleine koperdoseringen op de oxidatiesnelheid van fosfatiden. De fosfatiden werden geïsoleerd uit melk die werd gewonnen onder uitsluiting van koperinfecties. Daartoe werd 18 kg „kopervrij gewonnen” melk gedurende 16 h bij 2°C in twee kopervrije glazen flessen opgeroomd. De ondermelk werd afgehevelde en de room gezuurd met een „kopervrij” zuursel. Na 20 h zuren bij 14°C werd de room gekarnd, waarna uit de verkregen boter de fosfatiden werden geïsoleerd volgens de M2-methode. De extractievloeistoffen werden kopervrij overgedestilleerd, de bufferchemicaliën werden tweemaal omgekristalliseerd uit dubbel gedestilleerd water. Het kopergehalte van 4 ml buffer pH 4,58 (0,05 M) bedroeg minder dan 0,08 µg.

Na 6 h schudden in het Warburg-apparaat hadden de fosfatiden waaraan 3 µg koper was toegevoegd 80 mm³ zuurstof opgenomen. De inhoud van de beide reactievaatjes van het in duplo uitgevoerde experiment werd vervolgens gemengd met ca. 25 g vers botervet. Na krachtig schudden werd het vet afgecentrifugeerd en organoleptisch beoordeeld als tranig. De zuurstofabsorptie bedroeg 80 mm³/100 mg fosfatiden, overeenkomend met 1,6 ml O₂/kg boter.

De oxidatie van fosfatide-solen blijkt dus sterk afhankelijk van twee factoren die eveneens grotendeels de houdbaarheid van boter in het koelhuis bepalen: pH en koper.

KOOPS en PETTE (1956) isoleerden uit boter fosfatiden met een verschillend kopergehalte, door aan het boterserum verschillende hoeveelheden koper toe te voegen. Uit hun experimenten werd de conclusie getrokken dat de invloed van koper op de oxidatie van fosfatiden moet worden toegeschreven aan vrije koperionen. Deze conclusie geldt echter niet zonder meer voor boter. Uit experimenten die later worden beschreven zal blijken dat de invloed van koper zich in boter op een geheel andere wijze manifesteert.

Fig. 14. De invloed van mangaan, koper en ijzer op de zuurstofabsorptie van fosfatiden.

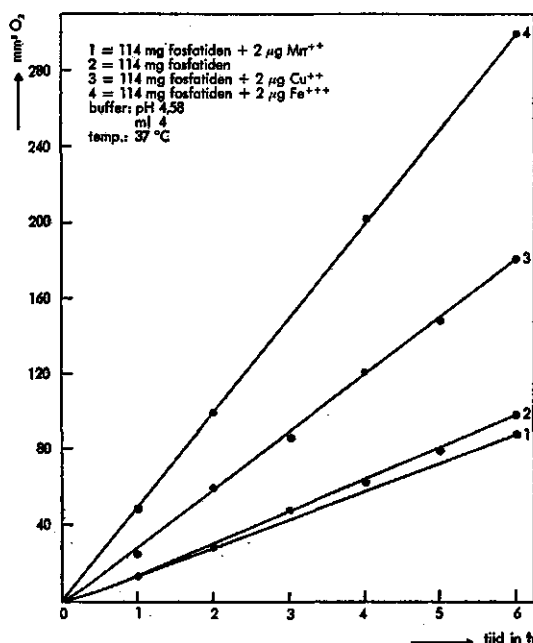


Fig. 14. The influence of manganese, copper and iron on the oxygen consumption of phospholipids.

In fig. 14 zijn de resultaten uitgezet die werden verkregen door aan fosfatiden (geïsoleerd uit boter volgens de M2-methode) resp. mangaan, koper en ijzer toe te voegen. Mangaanionen remmen de oxidatie van de fosfatiden enigszins. De invloed van ijzerionen blijkt veel groter dan die van koperionen, hetgeen in overeenstemming is met de resultaten van de onderzoeken van PAGE en BÜLOW (1935).

Indien aan dit modelsysteem ondermelk wordt toegevoegd, wordt de versnelde oxidatie van de fosfatiden onder invloed van ijzerionen volledig opgeheven (fig. 15). De fosfatiden waaraan geen ondermelk was toegevoegd werden gedispergeerd in 4 ml bifthalaat-natriumhydroxide buffer (pH 4,54), die met toevoeging van ondermelk in 1/20 M bifthalaat (pH 3,96). Na toevoeging van 0,8 ml momentaan gepasteuriseerde

ondermelk (90°C) en 2  $\mu\text{g}$  ijzer (0,5 ml van een aangezuurde standaardoplossing van  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ ) aan 4,2 ml bifthalaatoplossing, bedroeg de pH 4,54.

Fig. 15. De invloed van ondermelk, ijzer en ondermelk + ijzer op de zuurstofabsorptie van fosfatiden.

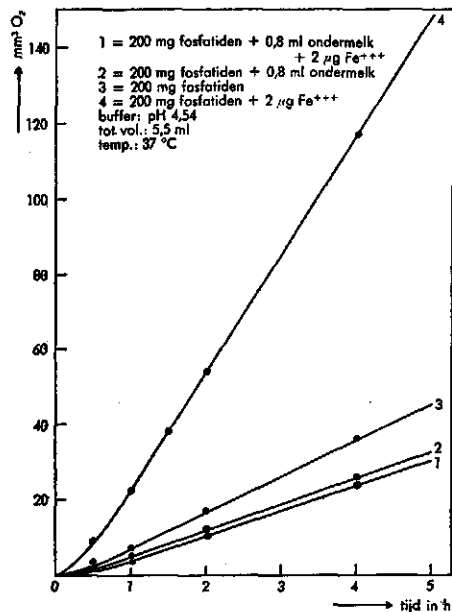


Fig. 15. The influence of skim milk, iron and skim milk + iron on the oxygen consumption of phospholipids.

Van het van nature aanwezige ijzer in de melk is ca. 25% gebonden aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes (MULDER en KOPPEJAN, 1953). KING c.s. (1959) stelden bij hun experimenten met radioactief ijzer vast, dat het niet aan de vetbolletjes gebonden natuurlijke ijzer is gebonden aan de caseïne en aan de wei-eiwitten. De wei-eiwitten zouden daarbij meer ijzer bevatten dan de caseïne. Wat het toegevoegde ijzer betreft werd geconstateerd, dat dit geheel door de plasmaeiwitten wordt gebonden (MULDER en KOPPEJAN, 1953; KING c.s., 1959). Het toegevoegde ijzer zou daarbij naar rato over de plasmaeiwitten zijn verdeeld (KING c.s., 1959). SCHÄFER c.s. (1956) echter concluderen uit hun proeven met behulp van elektroforese en ultracentrifugering, dat toegevoegd ijzer voornamelijk wordt gebonden aan de immuunglobulinen.

Het is echter duidelijk, dat de inactivering van ijzerionen berust op de binding van deze ionen aan de melkeiwitten. De ijzer-eiwitverbindingen in melk blijken dus geen katalytische activiteit te bezitten.

Het in fig. 10 voor botervet geconstateerde verschijnsel, dat koper-eiwitverbindingen de oxidatie van het botervet sterker bevorderen dan koper alleen, werd eveneens

waargenomen voor de fosfatiden (fig. 16). Dit experiment werd op dezelfde wijze uitgevoerd als het voorgaande.

Fig. 16. De invloed van ondermelk, koper en ondermelk + koper op de zuurstofabsorptie van fosfatiden.

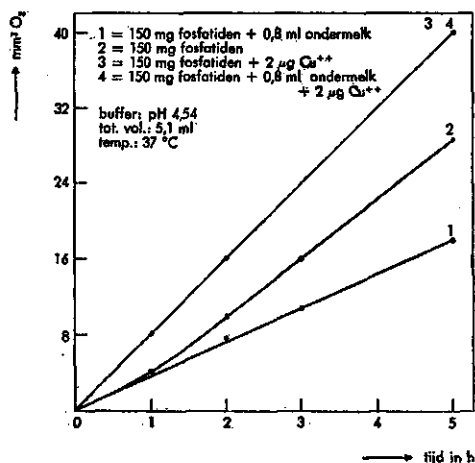


Fig. 16. The influence of skim milk, copper and skim milk + copper on the oxygen consumption of phospholipids.

De katalytische activiteit van koper-eiwitverbindingen komt eveneens zeer duidelijk tot uiting in experimenten, waarvan de resultaten zijn weergegeven in fig. 17. Fosfatiden, geïsoleerd volgens de M2-methode, werden gedispergeerd in de gebruikelijke buffer (0,05M), waarna eialbumine en/of koper werd toegevoegd. Eialbumine werd geïsoleerd uit verse eieren volgens de methode van KEKWICK en CANNAN (1936). De in deze experimenten toegevoegde hoeveelheid koper bleek geheel door het eiwit gebonden (ascorbinezuur-methode, Hfdst. V.5.2.).

Dezelfde experimenten werden uitgevoerd met  $\beta$ -lactoglobuline, geïsoleerd uit ondermelk volgens de methode van LARSON en JENNESS (Biochemical Preparations, 1955). Uit de resultaten (fig. 18) blijkt dat de oxidatie van fosfatiden onder invloed van koper +  $\beta$ -lactoglobuline sneller verloopt dan met koper of  $\beta$ -lactoglobuline alleen. De invloed is dus niet additief. Het toegevoegde koper bleek weer geheel gebonden door het  $\beta$ -lactoglobuline. De oorzaak van het feit dat  $\beta$ -lactoglobuline eveneens de oxidatie van de fosfatiden bevordert, zal waarschijnlijk moeten worden gezocht in koperbesmetting tijdens de uitzoutingsprocedure van het eiwit. Meestal is het kopergehalte van op dergelijke wijze verkregen eiwitten sterk verhoogd.

De gedachten worden dus wel sterk bepaald bij de invloed die eiwit, in combinatie met koper, uitoefent op de oxidatiesnelheid van de fosfatiden. In melk zijn de fosfatiden grotendeels aanwezig als een fosfatide-eiwitcomplex, waarbij een belangrijk deel van het in de melk aanwezige koper is geassocieerd met het eiwit van het zg. lipoproteïnecomplex (KING c.s., 1959). Dit maakt het wenselijk nader aandacht te

Fig. 17. De invloed van ei-albumine, koper en ei-albumine + koper op de zuurstofabsorptie van fosfatiden.

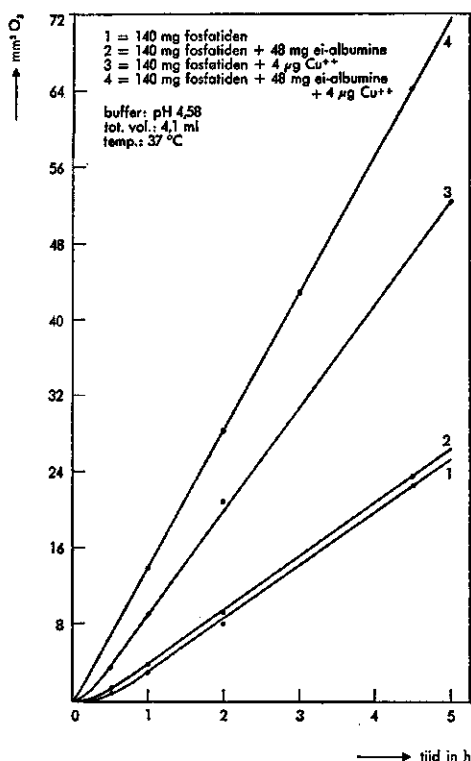


Fig. 17. The influence of egg albumin, copper and egg albumin + copper on the oxygen consumption of phospholipids.

schikken aan de factoren die invloed uitoefenen op de oxidatie van dit complex. Hierbij zullen wij ons beperken tot de fosfatiden van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. De in de ondermelk aanwezige fosfatiden zijn voor dit onderzoek van minder belang, hetgeen wordt verduidelijkt door de volgende berekening.

Gemengde melk bevat ongeveer 0,04% fosfatiden, waarvan ca. 60% voorkomt in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes (MULDER c.s., 1957). Indien wij het vetgehalte van gemengde melk op 3,80% stellen, bevatten 38 g vetbolletjes 240 mg fosfatiden en komen 160 mg fosfatiden voor in 962 g plasma. Tengevolge van de bewerkingen die de melk in het zuivelbedrijf ondergaat zal een gedeelte van het oppervlaktelaagje worden verwijderd. Uit onderzoekingen van KOOPS en TARASSUK (1959) is gebleken dat als gevolg hiervan ca. 20% van de in het oppervlaktelaagje aanwezige fosfatiden naar de ondermelk migreert. Na het centrifugeren zullen per 38 g vetbolletjes nog ca. 200 mg fosfatiden zijn gebonden en zal het plasma per 962 g eveneens 200 mg fosfatiden bevatten.

De room, waarvan wij het vetgehalte op 25% stellen, bevat per 250 g vetbolletjes



dus  $250/38 \times 200 = 1316$  mg fosfatiden; in 750 g plasma komen  $750/962 \times 200 = 156$  mg fosfatiden voor. Het fosfatidegehalte van de room zal dus ca. 0,15% bedragen, hetgeen in overeenstemming is met waarnemingen uit de praktijk. Uit bovenstaande berekening volgt dat ca. 90% van de totale hoeveelheid fosfatiden in room met 25% vet zich bevindt in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes.

De uit deze room bereide boter zal dus praktisch alleen fosfatiden bevatten die afkomstig zijn uit het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes.

Fig. 18. De invloed van  $\beta$ -lactoglobuline, koper en  $\beta$ -lactoglobuline + koper op de zuurstofabsorptie van fosfatiden.

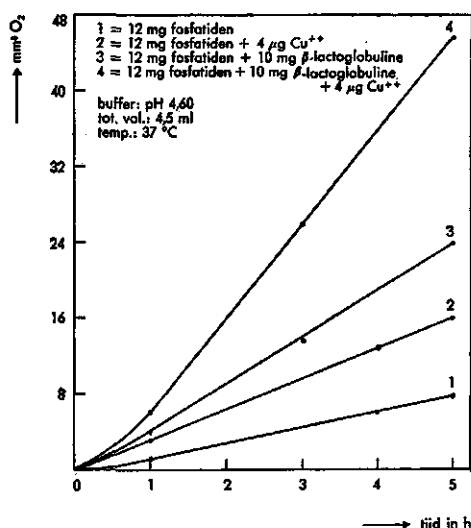


Fig. 18. The influence of  $\beta$ -lactoglobulin, copper and  $\beta$ -lactoglobulin + copper on the oxygen consumption of phospholipids.

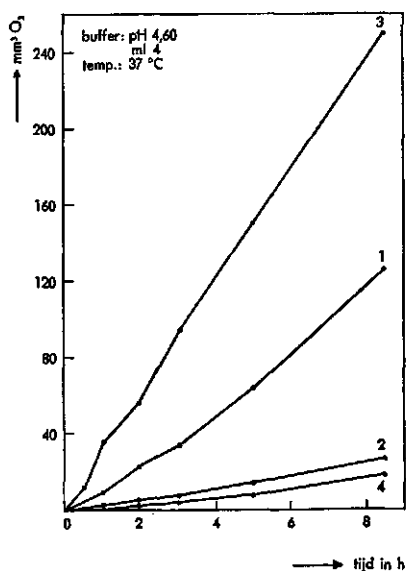
#### 4.3. Fosfatide-fracties

Uit verse boter werden de fosfatiden geïsoleerd volgens de M3-methode (niet met aceton behandelde, vetvrije fosfatiden) en daarna gescheiden in de respectievelijke fracties als is aangegeven in Hfdst. II. 5.2.2. Alle handelingen die moesten worden uitgevoerd waren erop gericht oxidatie van de fosfatiden en van de fosfatide-fracties zoveel mogelijk te voorkomen. De opbrengst aan fosfatiden na het verwijderen van het vet bedroeg 99,5% van de hoeveelheid waarvan was uitgegaan. De P-analyses van de fracties toonden aan dat de lecithine-, de cefaline- en de sfingomyeline-fractie resp. 31,2, 40,0 en 18,4% van de totale hoeveelheid lipide-fosfor bevatte. In het bij de scheiding van de fracties verkregen botervet was 5,4% van de lipide-fosfor aanwezig.

Van de vetvrije fosfatiden en de lecithine-, cefaline- en sfingomyeline-fractie werden resp. 199,7, 146,4, 49,9 en 87,9 mg gedispergeerd in 10 ml bifthalaat-natriumhydroxide

buffer (pH 4,6), waarna de Warburg-vaatjes in duplo werden gevuld met 4 ml van de solen. De zuurstofabsorptie van de vetvrije fosfatiden en de lecithine-, cefaline- en sfingomyeline-fractie werd berekend per 50 mg. De resultaten van dit experiment zijn verzameld in fig. 19. Uit deze figuur blijkt dat de zuurstofopneming van de fosfatiden

Fig. 19. De zuurstofabsorptie van fosfatiden en van de fosfatide-fracties



	Hoeveelheden der fracties in mg per 50 mg fosfatiden	O <sub>2</sub> -absorptie na 8½ h	% van totaal
1 = 50 mg fosfatiden	—	—	—
2 = 50 mg lecithine	15	7,8	6,3
3 = 50 mg cefaline	22,5	112,5	90,1
4 = 50 mg sfingomyeline	12,5	4,5	3,6
		124,8	

Fig. 19. *The oxygen consumption of phospholipids and of the phospholipid fractions.*

vrijwel geheel voor rekening van de cefaline-fractie komt. De lecithine-fractie nam slechts zeer weinig zuurstof op; de zuurstofabsorptie van de sfingomyeline-fractie dient vermoedelijk te worden toegeschreven aan verontreiniging van deze fractie met lecithine. Indien wij de gegevens betreffende de oxidatiesnelheid van de cefaline-fractie (fig. 19) vergelijken met die van botervet (fig. 11), blijkt dat de groep der cefalinen ruim 400 maal zo snel oxideert als het botervet (O<sub>2</sub>-opneming na 7 h).

De metingen van de zuurstofabsorptie van vetvrije fosfatiden en van de fosfatide-

fracties werden enkele malen herhaald. Representatieve gegevens van de daarbij gevolgde werkwijze volgen hieronder in beknopte vorm.

*Uitgangsmateriaal:* 1½ kg verse boter. Isolatie van fosfatiden volgens de M2-methode (zonder aceton-precipitatie). P-analyse in ruwe fosfatiden: 115,45; 116,90 en 116,32 mg P, gemiddeld 116,22 mg P = 3,015 g fosfatiden (0,201 %). De fosfatiden werden opgelost in chloroform-methanol (98 : 2, v/v, maatkolf 250 ml) en bewaard bij -40°C onder stikstof.

Vetvrije fosfatiden (M3-methode) 2 × 50 ml op 2 kolommen. Na elutie samengevoegd, geconcentreerd en opgenomen in chloroform-methanol (98 : 2, v/v, 100 ml). P-analyse: 46,18 en 45,95 mg P, gemiddeld 46,07 mg P = 1,195 g fosfatiden/100 ml.

$$\text{Opbrengst: } \frac{2,5 \times 1,195}{3,015} \times 100\% = 99,1\%.$$

*Scheiding in fracties:* 2 × 50 ml ruwe fosfatide-oplossing (2 × 0,603 g) op 2 kolommen. Na elutie werden de eluaten die overeenkomstige fracties bevatten samengevoegd en geconcentreerd. Het residu werd opgelost in chloroform-methanol (98 : 2, v/v, 100 ml) en bewaard bij -40°C onder stikstof. P-analyse: lecithine 30,27 en 30,03 %, gemiddeld 30,15 %; sfingomyeline 19,57 en 20,07 %, gemiddeld 19,82 %; cefaline 39,85 en 40,61 %, gemiddeld 40,23 % en vetfractie 0,23 % van totaal P. Totaal 90,43 %. De sfingomyeline-fractie was dus niet geheel geëluëerd. Na extractie van cefaline uit het geconcentreerde eluaat was hierin ca. 10 % van deze fractie achtergebleven.

*Voor de Warburg-experimenten werd uitgegaan van:*

a. 25 ml van de oplossing van de vetvrije fosfatiden:  $0,25 \times 1,195 \text{ g} = 298,8 \text{ mg}$ . Na concentreren onder N<sub>2</sub>-doorleiding, gedispergeerd in 15 ml bifthalaat-natriumhydroxide buffer (pH 4,49, 0,05M). De zuurstofabsorptie werd gemeten in triplo: 3 × 4 ml sol (3 × 79,7 mg).

b. 45 ml van de oplossing van de lecithine-fractie:  $0,45 \times 0,3015 \times 1,206 \text{ g} = 163,4 \text{ mg}$ . Na concentreren opgenomen in 10 ml buffer. Zuurstofabsorptiemeting in duplo: 2 × 4 ml sol (2 × 65,4 mg).

c. 40 ml van de oplossing van de sfingomyeline-fractie:  $0,40 \times 0,1982 \times 1,206 \text{ g} = 95,6 \text{ mg}$ . Na concentreren opgenomen in 10 ml buffer. Zuurstofabsorptiemeting in duplo: 2 × 4 ml sol (2 × 38,2 mg).

d. 10 ml van de oplossing van de cefaline-fractie:  $0,10 \times 0,402 \times 1,206 \text{ g} = 48,5 \text{ mg}$ . Na concentreren opgenomen in 15 ml buffer. Zuurstofabsorptiemeting in triplo: 3 × 4 ml sol (3 × 12,9 mg).

Kopergehalten (voor methode zie Hfdst. V. 2.) per 50 mg van de fosfatiden en van de lecithine- en cefaline-fractie resp. 3,0, 0,8 en 7,0 µg.

Fig. 20 geeft de resultaten van een van deze experimenten weer. De zuurstofabsorptie van de fosfatiden bleek nu vrijwel geheel voor rekening van de cefaline-fractie te komen. De sfingomyeline-fractie nam geen zuurstof op; de zuurstofabsorptie van de lecithine-fractie was zeer gering. Het grote verschil in gevoeligheid voor oxidatie tussen de lecithine- en de cefaline-fractie kan niet worden toegeschreven aan het ver-

Fig. 20. De zuurstofabsorptie van fosfatiden en van de fosfatide-fracties.

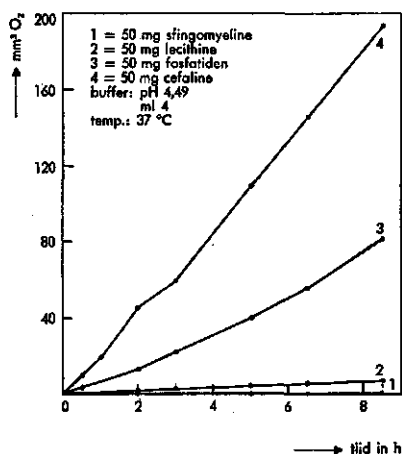


Fig. 20. The oxygen consumption of phospholipids and of the phospholipid fractions.

schil in kopergehalte van deze fracties. De lecithine-fractie neemt na toevoeging van  $6,2 \mu\text{g}$  koper méér zuurstof op, doch deze toevoeging zal het ruim dertigvoudige verschil in snelheid niet kunnen compenseren. De oxidatie van de fosfatiden zal dus ongetwijfeld aanvangen bij de cefaline-fractie. Op het belang hiervan voor de oxidatie van het oppervlaktelaagje komen wij in Hfdst. IV nader terug.

##### 5. VERANDERINGEN IN HET VETZUURPATROON VAN HET VET EN VAN DE FOSFATIDEN BIJ BEWARING VAN BOTER IN HET KOELHUIS

Uit de voorgaande experimenten is naar voren gekomen dat fosfatiden veel gevoeliger zijn voor oxidatie dan botervet. De zuurstofopneming van fosfatiden kon praktisch geheel worden toegeschreven aan de cefaline-fractie. De invloed van koper, de pH en van koper-eiwitverbindingen op de oxidatie van fosfatide-solen doet vermoeden dat de fosfatiden zeer nauw zijn betrokken bij het ontstaan van koelhuisgebreken van boter. Vooral omdat genoemde factoren hun invloed voornamelijk laten gelden via het serum van de boter. Het lag dus voor de hand na te gaan of tijdens bewaring van boter in het koelhuis veranderingen optreden in het vetzuurpatroon van de fosfatiden.

Room met een vetgehalte van 38,4% werd gedurende 10 sec gepasteuriseerd op een temperatuur van  $90^\circ\text{C}$  en vervolgens op de gebruikelijke wijze gezuurd. De gezuurde room werd in 2 porties verdeeld. Aan één van deze porties werd  $100 \mu\text{g}$  koper per liter room toegevoegd, waarna beide porties werden gekarnd.

Uit de boter bereid uit de room zonder kopertoevoeging ( $1\frac{1}{2}$  kg, kopergehalte  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), werden onmiddellijk na de bereiding de fosfatiden en het botervet geïsoleerd.

De boter bereid uit de room waaraan koper was toegevoegd, werd verdeeld in 2 porties van  $1\frac{1}{2}$  kg (kopergehalte  $58 \mu\text{g/kg}$ ); ze werden bewaard bij  $-10^\circ\text{C}$  en na resp. 6 en 12 maanden geanalyseerd. Het vetzuurpatroon van de fosfatiden en van het botervet werd bepaald volgens de in Hfdst. II. 6.2. beschreven methode, de joodadditiegetallen volgens de methoden van Wijs. De resultaten van het experiment zijn verzameld in tabel 12. Daar uit voorgaande experimenten was gebleken dat speciaal de cefaline-fractie uiterst gevoelig is voor oxidatie, werd verwacht dat aanwijzingen zouden worden gevonden dat in deze fractie veranderingen in het vetzuurpatroon optreden. Er kwamen echter zowel onregelmatigheden voor in de gevonden waarden voor de vetzuren van de cefaline-fractie, als in die van de lecithine-fractie. Een verklaring hiervoor is moeilijk te geven.

SWAIN en BRICE (1949) stelden vast dat tijdens voorzichtige autoxidatie van resp. linol- en linoleenzuur verbindingen werden gevormd die na alkalische isomerisatie dezelfde trieen- en tetraeenchromoforen gaven als resp. linoleen- en arachidonzuur.

PRIVETT en LUNDBERG (1951) onderzochten eveneens de veranderingen die in de spectrale karakteristieken optraden na alkalische isomerisatie van geautoxideerd linoleaat en linolenaat. Uit hun onderzoekingen kwam naar voren dat foutieve resultaten worden gevonden indien oxidatieprodukten van onverzadigde vetzuren worden geanalyseerd. Voor geautoxideerd linolenaat werden na alkalische isomerisatie de volgende waarden vastgesteld: 66,9% linoleenzuur, 17,8% arachidonzuur, 15,7% geconjugeerd diene en 0,7% geconjugeerd triene.

De resultaten van genoemde onderzoekingen doen vermoeden dat spectrofotometrisch verkregen gegevens betreffende onverzadigde vetzuren van vetten en vetachtige verbindingen die in geringe mate zijn geautoxideerd, met grote voorzichtigheid dienen te worden geïnterpreteerd.

BADINGS (1960) analyseerde van de genoemde partijtjes boter op dezelfde tijdstippen gaschromatografisch het vetzuurpatroon van de fosfatiden als geheel. Ook langs deze weg konden, na bewaring van de boter in het koelhuis, geen verschillen worden waargenomen. Wellicht zijn de veranderingen die in het vetzuurpatroon optreden van zó geringe omvang dat de huidige methoden ontoereikend zijn om dit te achterhalen. Een vraag blijft echter waarom indien aan room koper wordt toegevoegd, wél een duidelijke daling van het joodadditiegetal optreedt (tabel 8) en waarom dit niet het geval is bij tranige koelhuisboter, tenzij in het eerste geval de oxidatie van de fosfatiden (veel) verder is voortgeschreden.

Zoals reeds eerder is opgemerkt vertoont het oxidatiepatroon een dynamisch karakter. Elke chemische analyse of organoleptische beoordeling geeft een beeld van de situatie waarin dit dynamische systeem op het moment van de waarneming verkeert (BADINGS, 1960). Zo zal naast de vorming van hydroperoxiden ook afbraak van deze vetzuurhydroperoxiden optreden tot carbonylverbindingen, waarbij de vorming sneller verloopt dan de afbraak (stijging peroxidegetal).

Onder 3. van dit hoofdstuk werd gesteld dat tranigheid in fosfatide-solen optrad bij een zuurstofabsorptie van  $1,8 \text{ ml/2 g}$  fosfatiden. Op het moment van de organolep-

Tabel 12. Het gehalte aan onverzadigde vetzuren van botervet, fosfatiden en van de fosfatide-fracties van verse boter en van de boter na bewaring gedurende respectievelijk 6 en 12 maanden bij  $-10^{\circ}\text{C}$ .

On- verzadigde maan- vetzuren	Na	Botervet				Fosfatiden				Lecithine				Cefaline				Sfingomyeline				Smaak van de boter
		ge- conj.	niet conj.	mono- zuren	jood- getal	ge- conj.	niet conj.	mono- zuren	jood- getal	ge- conj.	niet conj.	mono- zuren	jood- getal	ge- conj.	niet conj.	mono- zuren	jood- getal	ge- conj.	niet conj.	mono- zuren	jood- getal	
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
0																						
Monoon		1,17		30,7		1,25	3,18	32,3		0,70	2,50	2,33	4,32									
Dien		1,04																				
Trien		0,83			35,6		1,65				1,16		2,19									normaal
Tetraeen		0,23					1,15				0,57		1,58									
Pentaen		0,29					1,64				0,55		2,68									
6																						
Monoon		1,18	0,92	30,7		1,25	3,06	32,3		0,80	2,46	2,56	4,86									
Dien																						
Trien		0,83			35,5		1,68				1,16		2,30									vettig
Tetraeen		0,20					1,16				0,62		1,59									
Pentaen		0,27					1,60				0,63		2,22									
12																						
Monoon		1,21	0,97	30,3		1,41	4,21	27,2		0,48	2,23	2,60	5,47									
Dien																						
Trien		0,81			35,2		1,98				0,88		2,48									Licht tranig
Tetraeen		0,24					1,44				0,42		2,01									
Pentaen		0,25					1,77				0,40		2,44									

Table 12. Poly unsaturated fatty acids of butter fat, phospholipids and phospholipid fractions of fresh butter and of the butter after storage at  $-10^{\circ}\text{C}$  for 6 and 12 months respectively.

tische beoordeling was dus 0,08 mmol zuurstof opgenomen. Indien wij aannemen dat deze hydroperoxiden geheel zijn omgezet tot carbonylverbindingen, zou 0,08 mmol van deze verbindingen zijn gevormd. Berekend als decadienal komt deze hoeveelheid overeen met 12 mg/kg boter, een concentratie van ca.  $1 : 10^5$ . Van de totale hoeveelheid opgenomen zuurstof zal echter het grootste gedeelte nog aanwezig zijn in de vorm van hydroperoxiden. De in werkelijkheid in boter gevormde hoeveelheid carbonylverbindingen zal dientengevolge, mede doordat in fosfatide-solen de carbonylverbindingen direct zijn blootgesteld aan verdere oxidatie, slechts een fractie bedragen van de berekende hoeveelheid.

Uit de literatuur is bekend dat tot sterke smaakafwijkingen aanleiding gevende carbonylverbindingen, organoleptisch zijn waar te nemen in concentraties van  $1 : 10^6$ – $10^9$ , hetgeen zou betekenen dat slechts 0,1–0,0001 deel van de bovengenoemde berekende hoeveelheid carbonylverbindingen behoeft te worden gevormd. Het gehalte aan resp. linoleen- en arachidonzuur benevens de pentaenzuren van fosfatiden bedraagt ca. 5%. Per kg boter (0,2% fosfatiden) zijn dus 100 mg van deze vetzuren aanwezig. Dit komt, bij een gemiddeld moleculair gewicht van 280, overeen met 0,36 mmol. Gebaseerd op een concentratie van  $1 : 10^6$  zouden dan 0,008 mmol carbonylverbindingen (decadienal) zijn gevormd, hetgeen betekent dat naast de aanwezigheid van een hoeveelheid vetzuurhydroperoxiden ca. 2% van deze vetzuren zal zijn geoxideerd tot carbonylverbindingen. Het is, in het raam van deze berekeningen bezien, niet onwaarschijnlijk dat in tranige koelhuisboter slechts een zeer gering gedeelte van de onverzadigde vetzuren zal zijn geoxideerd.

## OXIDATIE VAN HET OPPERVLAKTELAAGJE VAN DE VETBOLLETJES

## 1. INLEIDING

De vetbolletjes in melk zijn omgeven door een oppervlaktelaagje. Het is niet gemakkelijk om dit oppervlaktelaagje uit melk te isoleren zonder een gedeelte van het membraan te verliezen of zonder ook andere melkbestanddelen mede af te scheiden. De gebruikelijke wijze van afzondering berust op een verdunning van de melk met water of met een fysiologische zoutoplossing, waarna het verdunde melkplasma wordt verwijderd. Deze bewerking wordt vervolgens enkele malen herhaald, waarna uit de gewassen room het oppervlaktelaagje wordt geïsoleerd. Het is duidelijk dat uiteindelijk alleen de verbindingen overblijven die stevig aan het vetbolletje zijn gebonden.

Van groot belang bij het onderzoek naar de bouw van lipoproteïnen is de vraag hoe men zich de bindingen tussen de fosfatiden en het eiwit moet voorstellen. Hierover is nog niet veel bekend.

In de laatste decennia zijn de lipoproteïnen uit bloed, mede in verband met het atherosclerosevraagstuk, uitvoerig bestudeerd. MACHEBOEUF (1929) isoleerde als eerste een lipoproteïne-fractie uit bloed door middel van uitzouting. COHN c.s. (1946) fractioneerden de lipoproteïnen met behulp van ethanol-watermengsels bij lage temperatuur en lage ionensterkte. Zij toonden aan dat in menselijk bloedserum twee belangrijke, lipiden-bevattende eiwit-fracties voorkomen:  $\alpha$ - en  $\beta$ -lipoproteïnen. BLIX c.s. (1944) pasten vrije elektroforese toe. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van papier- en zetmeelelektroforese. CARLSON (1960) scheidde serumlipoproteïnen via kolommen gevuld met glaspoeder door middel van elutie met een reeks buffers met stijgende pH.

Een van de belangrijkste hulpmiddelen bij het onderzoek van lipoproteïnen is het dichtheitsonderzoek met behulp van de ultracentrifuge. De dichtheid van de tot nu toe bekende lipoproteïnen blijkt nl. kleiner dan die van de andere serumeiwitten (GOFMAN, 1949). De flotatie in sera waarvan de dichtheid wordt verhoogd door toevoeging van minerale zouten, wordt door middel van een optisch systeem vastgelegd, waarna de relatieve concentratie van de fracties kan worden bepaald. Door toepassing van verschillende dichtheden werden o.a. „low density” ( $\beta$ ) en „high density” ( $\alpha$ ) lipoproteïnen verkregen.

Het onderzoek van lipoproteïnen wordt bemoeilijkt door de labiliteit van deze verbindingen. COHN (1949) constateerde dat  $\alpha$ -lipoproteïnen, geïsoleerd uit vers bloed en uit bloed dat 72 h was bewaard, verschillen in oplosbaarheid vertoonden. DAVISSON (1953) stelde vast dat de heterogeniteit van lipoproteïnen toenam indien ze werden gedialyseerd tegen gebufferde oplossingen van natriumchloride of tegen water. Er



verschenen meer „low density” lipideverbindingen en de flotatiesnelheid verminderde.

CRESPI (1955) isoleerde de „low density” lipoproteïnen uit de bloedsera van mens, hond, konijn en kip en ging de factoren na die invloed uitoefenden op de stabiliteit van deze verbindingen. Door dialyse-experimenten werd aangetoond dat in het flotatiebeeld karakteristieke veranderingen optraden indien cupri-ionen aanwezig waren in de voor het dialyseren gebruikte buffer. Indien de koperionen werden gebonden, bijv. door toevoeging van het dinatriumzout van ethyleendiaminetetra-azijnzuur, traden deze verschijnselen niet op. Eveneens werd onderzocht in hoeverre andere kationen wijzigingen veroorzaakten in het flotatiebeeld. De  $\beta$ -lipoproteïnen bleken stabiel in aanwezigheid van de volgende ionen:  $\text{Au}^{+++}$ ,  $\text{Pt}^{++}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Sn}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$  en  $\text{Ni}^{++}$ ; alleen koperionen veroorzaakten een wijziging in het gedrag. Indien het modelsysteem na toevoeging van koper werd verzadigd met stikstof, waren de  $\beta$ -lipoproteïnen stabiel. Toevoeging van  $\text{H}_2\text{O}_2$ , of bestraling met  $\text{Co}^{60}$  in aanwezigheid van koperionen, verhoogde de instabiliteit. Met behulp van manometrische experimenten en door toepassing van infrarode en ultraviolette spectrofotometrische analyse kon worden aangetoond dat de veranderingen in het flotatiebeeld werden veroorzaakt door oxidatie van de  $\beta$ -lipoproteïnen onder invloed van koperionen. Deze veranderingen konden worden voorkomen door anti-oxidanten toe te voegen.

Over de structurele opbouw van het lipoproteïnecomplex in bloed valt nog maar weinig met zekerheid te zeggen. Door de parallel gerangschikte fosfatide-moleculen worden bimoleculaire lagen gevormd, waarbij de polaire groepen naar buiten en de apolaire ketens naar het binnenste van de „sandwichmicel” zijn gericht. Triglyceriden, cholesterol en cholesterolsters bevinden zich wellicht tussen de koolwaterstofketens van de fosfatiden (Van der Waals-krachten en waterstofbruggen). De micel is aan twee zijden bedekt met een laag eiwitten. De belangrijkste evidentie hieromtrent stamt van het elektronenmicroscopische onderzoek.

Het onderzoek naar de samenstelling en de opbouw van het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes is niet eenvoudig. MULDER (1947) wees er terecht op dat men bij de bestudering ervan meer dan tot nu toe rekening moet houden met de wijze waarop de melk in de uier van de koe wordt gevormd. De vetbolletjes worden op een andere plaats in de cellen van de melkklier gevormd dan het melkplasma. Dientengevolge zullen ze reeds zijn omgeven door een dun laagje van het omringende protoplasma, vóórdat ze in contact komen met het melkplasma. Daarnaast kan een tweede laagje aanwezig zijn, bestaande uit melkplasmabestanddelen. Dit zou reversibel adsorbeerbaar kunnen zijn, zulks in tegenstelling tot het protoplasmalaagje.

Het oppervlaktelaagje bestaat voornamelijk uit fosfatiden, eiwitten en triglyceriden (PALMER c.s., 1932-1939). De hoeveelheden van elk van deze verbindingen (uitgezonderd de triglyceriden) konden eerst voldoende nauwkeurig worden bepaald, nadat MULDER (1957) hiervoor een methode had ontwikkeld.

Zo kon de hoeveelheid fosfatiden in het oppervlaktelaagje worden gesteld op ge-

middeld 600 mg/100 g vetbolletjes (MULDER c.s., 1957). De onderlinge verhouding van lecithine, cefaline en sfingomyeline in melk, room, ondermelk, karnemelk en boter is vrijwel constant (Hfdst. II. 4.). Ook de vetzuursamenstelling van de fosfatiden in deze produkten verschilt weinig (BADINGS en KOOPS, 1960). Uit het eerstgenoemde gegeven kan worden berekend, dat per 100 g vetbolletjes in het oppervlaktelaagje resp. ca. 180 mg lecithine, 270 mg cefaline en 150 mg sfingomyeline voorkomen.

PALMER en WIESE (1933) stelden de aanwezigheid van een „hoog smeltend” triglyceride vast in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. JENNESS en PALMER (1945b) onderzochten enkele chemische eigenschappen van de in ethanol onoplosbare fractie van deze triglyceriden: het joodadditiegetal bedroeg 5,0–7,1, het smeltpunt 52–53°C. THOMPSON c.s. (1959) verrichtten een uitvoerige analyse van de hoog smeltende triglyceriden uit het oppervlaktelaagje van vetbolletjes in gewassen room, waarbij o.m. gebruik werd gemaakt van infrarode en ultraviolette spectrofotometrische analyse en gaschromatografisch onderzoek. Het joodgetal bedroeg 4,8–5,0, het smeltpunt 50,0–52,5°C; de vetzuren waren als volgt samengesteld (in mol. %): C<sub>10</sub> 0,1; C<sub>12</sub> 0,9; C<sub>14</sub> 11,0; C<sub>16</sub> 59,6; C<sub>18</sub> (verzadigd) 16,5; C<sub>18</sub><sup>1</sup> 5,6; C<sub>18</sub><sup>2</sup> 0,4 en C<sub>18</sub><sup>3</sup> 0,2 (niet geïdentificeerde componenten 5,7%). Het oppervlaktelaagje bevatte ca. 45% gebonden vet; het in het membraan aanwezige vet zou vrijwel geheel bestaan uit hoog smeltende triglyceriden (THOMPSON c.s., 1961).

De betrouwbaarste gegevens betreffende de hoeveelheid eiwit in het oppervlaktelaagje zijn afkomstig van MULDER en MENDER (1958). Voor ongeveer 50 monsters melk berekenden zij dat op het oppervlak van 100 g vetbolletjes 0,1 tot 3 g eiwit voorkomt. In normale melk zouden 100 g vetbolletjes gemiddeld 0,8 g eiwit bevatten.

Gegevens over de samenstelling en eigenschappen van het membraaneiwit dienen met de grootste reserve te worden geïnterpreteerd. Het is tot nu toe n.l. nog niet gelukt het eiwit uit het oppervlaktelaagje kwantitatief in oplossing te brengen. Uit serologische experimenten van MULDER en MENDER (1958) is gebleken dat preparaten van het oppervlaktelaagje o.a. caseïne, melkalbumine en melkglobuline bevatten.

BRUNNER c.s. (1953) concluderen uit het sedimentatiebeeld bij ultracentrifugering dat het membraaneiwit waarschijnlijk kan worden geklassificeerd als een eiwit met globulineachtige eigenschappen.

Volgens HERALD en BRUNNER (1957) bestaan de membraaneiwwitten uit twee fracties die in vrijwel gelijke hoeveelheden voorkomen. De in 0,02 M NaCl oplosbare, gereinigde fractie bevatte 11,1%, de in deze zoutoplossing onoplosbare fractie 13,8% stikstof. Laatstgenoemde fractie zou dezelfde eigenschappen hebben als de pseudokeratinen. Het gemiddelde stikstofgehalte zou ca. 12,5% bedragen, hetgeen in overeenstemming is met reeds eerder gevonden waarden. De in 0,02 M NaCl oplosbare fractie vertoonde bij elektroforese 3 banden, de in deze zoutoplossing onoplosbare fractie 1 of 3, afhankelijk van het gebruikte oplosmiddel. Het lukte echter niet ze nader te karakteriseren (BRUNNER en HERALD, 1958).

Behalve de reeds genoemde verbindingen komen in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes tevens cholesterol (al of niet veresterd), carotenoiden en vit. A voor,

benevens mono- en diglyceriden, enzymen, zware metalen en gebonden water (MULDER, 1947, 1957; KING, 1955; MULDER en ZUIDHOF, 1958).

Over de opbouw van het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes kan niet veel met zekerheid worden gezegd. KING (1955) stelt zich deze op de volgende wijze voor (fig. 21): de primaire laag zou bestaan uit een enkelvoudige bedekking van radiaal

Fig. 21. De opbouw van het oppervlaktelaagje volgens KING (1955).

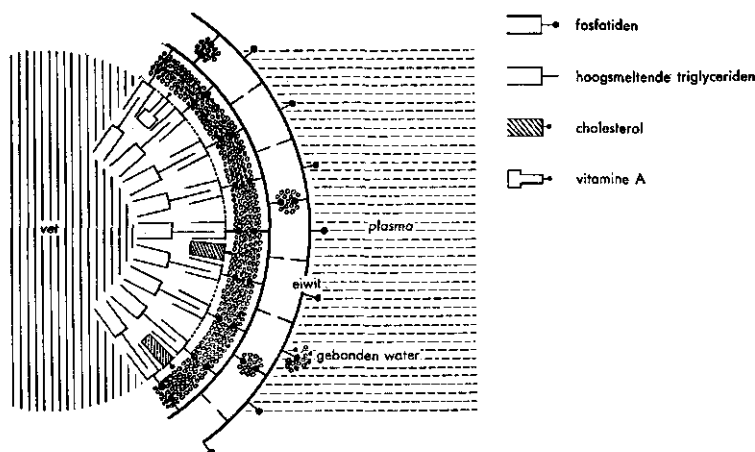


Fig. 21. Structure of the fat globule membrane according to KING (1955).

georiënteerde fosfatide-moleculen, waarvan de koolwaterstofketens zich in de vetfase en de twee hydrofiële ionogene groepen zich in de waterfase bevinden. De binding tussen de lipoproteïnen en de hoog smeltende triglyceriden is vrij sterk, hetgeen wordt gedemonstreerd door het feit dat bij het uitsmelten van boter tezamen met de lipoproteïnen, een groot gedeelte van deze triglyceriden terecht komt in het boterserum.

De secundaire laag zou uit membraaneiwit bestaan, waarvan de geïoniseerde hydrofiële zijketens (vrije  $\text{NH}_2$ -guanidine-imidazol en  $\text{COOH}$  groepen) naar de geïoniseerde groepen van de fosfatiden zijn gericht en verbonden zijn door elektrostatische krachten (Coulomb interacties). De lipofiele koolwaterstofketens van de eiwitten, die naar de andere zijde van het eiwitlaagje zijn gericht, zouden het vetbolletje een zekere graad van hydrofobie verlenen. De hydrofobe zijketens zouden op hun beurt weer kunnen zijn gericht naar die van een tweede eiwitlaagje, waarvan de hydrofiële zijketens met de ionogene groepen naar het melkplasma zijn gericht. Deze ionogene groepen zouden dan verantwoordelijk zijn voor de elektrische lading van de vetbolletjes.

De door KING geschematiseerde opbouw van het oppervlaktelaagje is weinig geargumenteerd en draagt een statisch karakter, hij houdt geen rekening met het ontstaan van de vetbolletjes in de uier van de koe. In grote trekken komt deze opbouw overeen met de huidige opvatting omtrent de structuur van celmembranen (DANIELLI,

1958): met uitzondering van de celkernmembranen zouden deze bestaan uit 2 of meer lagen fosfatide-moleculen met aan elke kant een eiwitlaagje. Waar het hier over het algemeen membranen betreft aan water/water grensvlakken, in tegenstelling tot een water/vet grensvlak in melk, kan men zich voorstellen hoe KING is gekomen tot de opbouw van 1 laagje fosfatiden, 1 laagje (gedenatureerd) eiwit en vervolgens 1 laagje (natief) eiwit.

Volgens MORTON (1954) zou het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes bestaan uit een continu eiwitlaagje, waarop (submicroscopische) lipoproteïnedeeltes zijn ge-adsorbeerd met een diameter van 30–200 m $\mu$ . Deze voorstelling van zaken is echter moeilijk te verenigen met het feit dat bij het karnen van gewassen room de verhouding fosfatiden/eiwit in het boterplasma hoger is dan in de karnemelk.

BAUD (1953) spreekt naar aanleiding van de structuur van het celkernmembraan van een „patchwise distribution of phospholipids in a continuous protein carpet”. De microfoto's van HANSSON (1949) van het oppervlaktelaagje van melkvetbolletjes doen eenzelfde structuur vermoeden. De in de laatste jaren geuite veronderstelling dat celmembranen een poreuze structuur hebben, berust op interpretatie van foto's verkregen met behulp van de elektronenmicroscop. De poreuze structuur van het membraan zou kunnen worden veroorzaakt door denaturatie van het eiwit tengevolge van de extractie van de lipiden en/of door het voortdurende bombardement met elektronen. Bovendien kunnen tijdens het prepareren van de coupes (fixeren van room met osmiumtetroxydoplossing, inbedden in methacrylaat en polymeriseren, KNOOP 1959) artefacten optreden. Het is niet zeker dat de voorstellingen die men zich op grond van deze foto's maakt van de opbouw van het membraan, met de werkelijkheid overeenstemmen.

## 2. ISOLATIE EN SAMENSTELLING VAN HET OPPERVLAKTELAAGJE

Verse, rauwe, niet-gekoelde melk waarvan de temperatuur niet was gedaald beneden ca. 32°C, werd gecentrifugeerd, waarna de room (met 20–25% vet) werd gewassen met een viervoudige hoeveelheid kopervrij water (37°C). Deze bewerking werd herhaald totdat de melkplasmabestanddelen vrijwel volledig waren verwijderd, hetgeen werd nagegaan door in de gewassen room te reageren op lactose (KOEHLER, 1952). De gewassen room werd afgekoeld en gedurende enkele uren bewaard bij 12°C en vervolgens gekarnd. Om zoveel mogelijk vrij vet te verwijderen uit het door uitsmelten verkregen serum van de boter, werd nog gedurende 2 h gecentrifugeerd in een Servall centrifuge (1°C, 10 400 g). Na verwijdering van de vetlaag werd het serum gevriesdroogd en onder stikstof bewaard bij –40°C. In het aldus verkregen preparaat werden de volgende analyses uitgevoerd:

a. Gehalte aan drogestof:  $2 \times 100$  mg (duplo) in zandschaaltjes bij 105°C tot constant gewicht.

b. Gehalte aan fosfatiden:  $2 \times 14$  mg (duplo) werden geëxtraheerd volgens de

Mojonnier-modificatie van de methode Röse-Gottlieb (V 1308). Na afwegen van het preparaat werden aan de extractiebuisen resp. 10 ml gedestilleerd water, 2 ml ammonia 6 N, 10 ml ethanol (96%), 25 ml peroxidevrije ether (VOGEL, 1954) en 25 ml petroleumether toegevoegd. Na elke toevoeging werd geschud. De ether-petroleumether-extracten werden afgeschonken in destructiebuisen, waarna de vluchtige oplosmiddelen werden afgedestilleerd. De extractie werd twee maal herhaald. De gedestilleerde droogresten werden overgespoeld in maatkolpjes van 100 ml, waarin na aanvulling tot 100 ml, het fosforgehalte werd bepaald (GRISWOLD c.s., 1951).

c. Gehalte aan eiwit:  $3 \times 40$  mg (triplo) volgens een micro-Kjeldahl methode (KOOFS, 1958). Van de totale hoeveelheid stikstof werd de fosfatide-stikstof afgetrokken. Ter berekening van de hoeveelheid eiwit, werd daarna vermenigvuldigd met 100

12,4

d. Gehalte aan vrij vet : 1 g van het preparaat werd in een mortiertje aangewreven met 10 ml gedestilleerd water; de suspensie werd kwantitatief overgebracht in een centrifugebuis met ingeslepen stop. Het mortiertje werd vervolgens viermaal met 5 ml petroleumether (kpt. 40–60°C) nagewassen. De porties petroleumether werden overgebracht in de centrifugebuis, waarna de beide lagen werden gemengd. Na centrifugeren (10 min 2000 rpm) werd de petroleumetherlaag overgebracht in een gewogen kolfje. De extractie werd nog tweemaal herhaald met telkens 20 ml petroleumether. Na verwijdering van de petroleumether werd het kolfje in vacuüm gedroogd en gewogen.

e. Gehalte aan gebonden vet: De met petroleumether gewassen waterlaag (sub d) werd, na toevoeging van 50 ml 0,1 M kaliumbifthaltaat-natriumhydroxide buffer (pH 4,6), overgebracht in een scheitrechter en druppelsgewijze gevoegd bij 260 ml ethanol-tetrachloorkoolstof (4 : 1, v/v). De centrifugebuis werd twee keer nagespoeld met telkens 50 ml van het ethanol-tetrachloorkoolstofmengsel. Uit het ethanol-tetraextract werd een M2-extract bereid (zonder aceton-precipitatie), uit dit extract werden de triglyceriden chromatografisch geïsoleerd (Hfdst. II. 3.3.3). Het chloroform-methanolelueaat (98 : 2, v/v) werd opgevangen in een gewogen kolfje. Na verwijdering van de vluchtige oplosmiddelen werd het kolfje in vacuüm gedroogd en gewogen.

Tabel 13. Samenstelling van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes, geïsoleerd uit gewassen room.

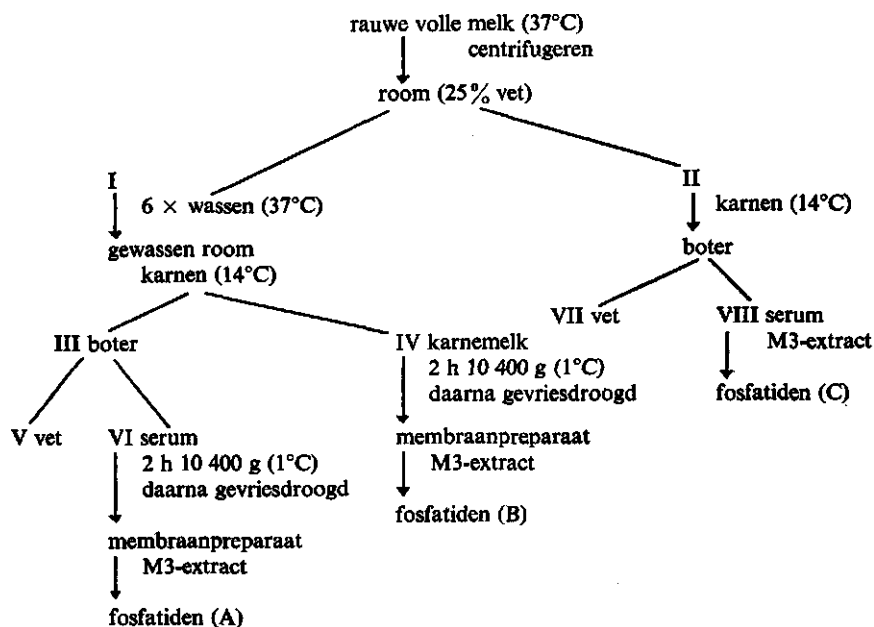
Expt.nr.	Eiwit	Fosfatiden	$\frac{\text{Eiwit}}{\text{Fosfatiden}}$	Gebonden vet
	%	%		%
1	47,1	22,8	2,1	31,3
2	43,6	22,4	1,9	34,1
3	40,3	19,9	2,0	42,8

Table 13. *Composition of the fat globule membrane, isolated from washed cream.*

Op de boven omschreven wijze werd uit een drietal monsters melk het oppervlaktelaagje geïsoleerd en geanalyseerd. De resultaten van deze experimenten zijn samengevat in tabel 13, de gehalten werden gecorrigeerd voor vocht en vrij vet. Met nadruk wordt er nogmaals op gewezen, dat deze gegevens betrekking hebben op het deel van het oppervlaktelaagje dat door wassen niet wordt verwijderd.

Uit deze waarnemingen blijkt dat de verhouding eiwit/fosfatiden in het oppervlaktelaagje van gewassen room vrijwel constant is. Indien wij het „niet-reactieve deel” van het oppervlaktelaagje (de hoog smeltende triglyceriden) buiten beschouwing laten, blijkt dat het laagje is samengesteld uit 67% eiwit en 33% fosfatiden.

Ten einde na te gaan of de membraanfosfatiden van boter uit gewassen room representatief zijn voor die van boter uit normale room, werd de vetzuursamenstelling gaschromatografisch vergeleken (BADINGS, 1960). De isolatie vond plaats volgens onderstaand schema; de te centrifugeren melk en de te wassen room werden met het oog op een voldoende stabiliteit van de emulsie, op een temperatuur van 37°C gehouden.



Tijdens het karnen van gewassen room trad geen specifieke verdeling op van de fosfatiden tussen de boter en de karnemelk; het vetzuurpatroon van de A-fosfatiden kwam overeen met dat van de B-fosfatiden. Ook kon geen verschil worden geconstateerd tussen de A- en de C-fosfatiden. De zuurstofopneming van solen van A, B en C bij pH 4,60 was eveneens gelijk.

Het vetzuurpatroon van de hoog smeltende triglyceriden bleek, in volgorde van belangrijkheid, voornamelijk samengesteld uit verzadigde C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> en C<sub>14</sub> vetzuren,

benevens kleine hoeveelheden verzadigde  $C_{12}$  en  $C_{10}$  vetzuren. Daarnaast kwamen sporen monoëen- en polyëenzuren voor. De hoog smeltende triglyceriden zullen dus vrijwel geen bijdrage leveren in de zuurstofabsorptie van het lipoproteïnecomplex.

### 3. DE ZUURSTOFABSORPTIE VAN HET OPPERVLAKTELAAGJE. FACTOREN DIE HIEROP INVLOED UITOEFENEN

#### 3.1. Inleiding

Uit de in Hfdst. III. 4.2. besproken experimenten kwam naar voren dat de zuurstofabsorptie van de fosfatiden wordt versneld door toevoeging van koper. Eiwit-koper-verbindingen bleken de zuurstofabsorptie méér te verhogen dan koper alleen.

De gedachten worden dus ten eerste bepaald bij de factoren die invloed uitoefenen op de gevoeligheid voor oxidatie van het lipoproteïnecomplex. In dit gedeelte zal hieraan nader aandacht worden geschonken. Achtereenvolgens zal worden nagegaan, welke de invloed is van de pH, koper- en andere ionen, eiwitten, de temperatuur, antioxidanten en enkele andere factoren. Daarbij zullen al deze factoren echter niet strikt gescheiden worden gehouden.

De invloed van de pH (en van de andere factoren) op de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje werd nagegaan met behulp van het Warburg-apparaat. Daarbij

Tabel 14. Bereidingswijze van 0,1 M buffers in het pH-traject 6,8–1,6.

pH	$KH_2PO_4$ M/5	$COOH\ C_6H_4\ COOK$ M/5	KCl M/5	NaOH M/5	HCl M/5	Met dubbel gedestilleerd water tot
	ml	ml	ml	ml	ml	ml
6,8	50	—	—	23,65	—	100
5,8	—	50	—	43,00	—	100
5,4	—	50	—	35,45	—	100
5,0	—	50	—	23,85	—	100
4,6	—	50	—	12,15	—	100
4,4	—	50	—	7,50	—	100
4,2	—	50	—	3,70	—	100
4,0	—	50	—	0,40	—	100
3,8	—	50	—	—	2,63	100
3,6	—	50	—	—	5,97	100
3,4	—	50	—	—	9,90	100
3,0	—	50	—	—	20,32	100
2,4	—	50	—	—	39,60	100
2,0	—	—	50	—	10,60	100
1,6	—	—	50	—	26,30	100

Table 14. Preparation of 0,1 M buffers in the pH area 6,8–1,6.

werden buffers met verschillende pH gebruikt. Deze werden bereid op de in tabel 14 aangegeven wijze en werden met dubbel gedestilleerd water verdund tot 100 ml (0,1 M). Het volume aan vloeistof in de Warburg-vaatjes bedroeg steeds 4,50 ml. Het membraanmateriaal werd in dubbel gedestilleerd water gesuspenderd; 0,5 ml suspensie bevatte 50–100 mg van het oppervlaktelaagje.

### 3.2. De invloed van de pH

Een hoeveelheid room, verkregen door spontane oproming van melk die werd gewonnen onder uitsluiting van koperinfecties, werd op de aangegeven wijze gewassen

Fig. 22. De invloed van respectievelijk de pH, koper, TATD en van koper + TATD op de zuurstof-absorptie van het membraanmateriaal.

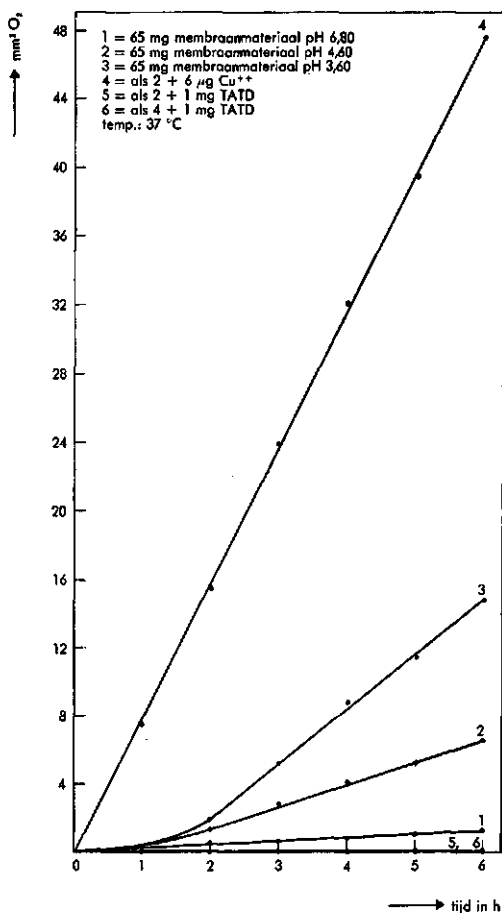


Fig. 22. The influence of pH, copper, TETD and of copper + TETD on the oxygen consumption of the membrane material.



met (kopervrij) tweemaal gedestilleerd water. Daarna werd uit de gewassen room het membraanmateriaal geïsoleerd. Alle bij de isolatie gebruikte recipiënten waren van te voren kopervrij gemaakt (bewaren in  $\text{HNO}_3$  van 6%, uitspoelen met gedestilleerd en dubbel gedestilleerd water).

Fig. 22 geeft een beeld van de zuurstofopneming van 65 mg membraanmateriaal bij pH-waarden van resp. 6,80, 4,60 en 3,60. Na 6 h schudden bij  $37^\circ\text{C}$  bedroeg de zuurstofabsorptie resp. 1,2, 6,4 en  $14,6 \text{ mm}^3$ . De zuurstofabsorptie wordt als gevolg van de verlaging van de pH dus sterk verhoogd. Het kopergehalte van het membraanmateriaal bedroeg  $7,0 \mu\text{g/g}$ , d.i. per 65 mg  $0,45 \mu\text{g}$ . Indien  $6 \mu\text{g}$  koper werd toegevoegd (pH 4,60), waardoor de concentratie aan koper ca. 14 maal zo hoog werd, was de zuurstofabsorptie na 4 h ca. 8 maal groter. De invloed van toegevoegd koper is dus niet additief ten opzichte van het natuurlijke koper (zie ook 3.3.).

Indien aan dit modelsysteem TATD wordt toegevoegd, blijft de zuurstofabsorptie geheel achterwege (fig. 22, nr. 5 en 6). TATD verwijdt het natuurlijke koper van

Fig. 23. De invloed van de pH op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

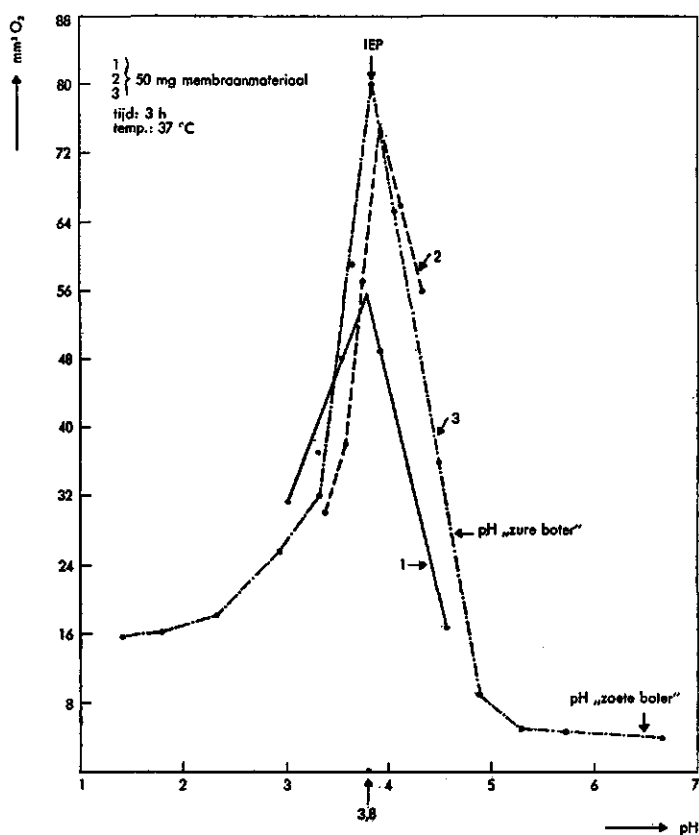


Fig. 23. The influence of pH on the oxygen consumption of the membrane material.

het membraaneiwit en vormt hiermede een TATD-koperverbinding. Dit heeft tot gevolg, dat de oxidatie van de fosfatiden in het membraan sterk wordt vertraagd. Blijkbaar is na 6 h de inductieperiode nog niet beëindigd. In hoeverre TATD in staat is de radicaalreactie te onderbreken, is een factor die in dit verband niet nader is onderzocht.

De invloed van de pH op de snelheid waarmee het membraanmateriaal zuurstof opneemt is nader verduidelijkt in fig. 23. De curven in deze figuur geven het verband aan tussen de pH en de zuurstofopneming van membraanmateriaal, geïsoleerd uit 3 verschillende porties melk. Het resultaat van de eerste, oriënterende proef (curve 1, 4 punten) doet vermoeden dat de maximale zuurstofabsorptie bij een pH van ca. 3,8 ligt. De resultaten van de twee andere experimenten (curve 2, 6 punten; curve 3, 13 punten) zijn hiermede in overeenstemming. Het maximum ligt tussen pH 3,8 en 4,0, hetgeen eveneens blijkt uit fig. 24A en fig. 24B. De zuurstofabsorptie van het lipoproteïnecomplex is bij pH 3,80 en 4,60 resp. 11–20 en 7–9,5 maal zo groot als bij pH 6,60 (fig. 23, 24A en B).

Fig. 24. De invloed van de pH op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal en op de uit het oppervlaktelaagje geïsoleerde fosfatiden.

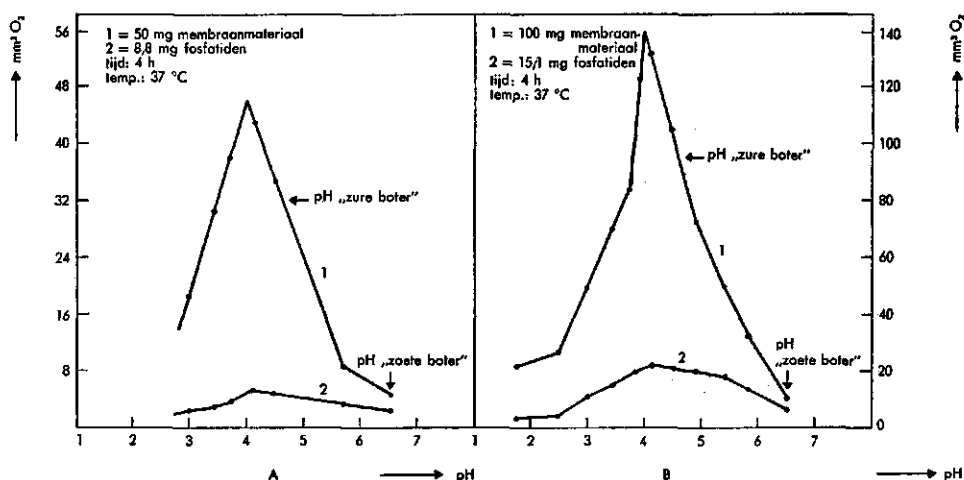


Fig. 24. The influence of pH on the oxygen consumption of the membrane material and on the phospholipids isolated from the fat globule membrane.

De grotere gevoeligheid van boter uit gezuurde room voor het ontstaan van oxidatiegebreken zou hierdoor gedeeltelijk kunnen worden veroorzaakt. In Hfdst. V zal nader worden uiteengezet dat een medium van lage pH ook nog op een andere wijze invloed uitoefent.

In de fig. 24A en B is tevens weergegeven het verschil in zuurstofabsorptie tussen fosfatiden in „vrije” toestand en een even grote hoeveelheid fosfatiden als lipoproteïnecomplex. De hoeveelheden koper in de beide systemen werden op hetzelfde

niveau gebracht, waarvoor een zeer geringe correctie noodzakelijk was. Het in Hfdst. III. 4.2. geconstateerde verschijnsel, dat toevoeging van eiwit aan fosfatide-solen de zuurstofabsorptie versnelt, komt in deze figuren, waar het een eiwit-fosfatide-complex betreft, duidelijk tot uiting.

De oorzaak van de snelle toeneming in zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje bij verlaging van de pH, moet vermoedelijk worden gezocht in elektrostatische interacties tussen de fosfatiden en het (koperbevattende) membraaneiwit, waardoor de voorwaarden voor oxidatie van de fosfatiden wellicht het gunstigst zijn.

Over de lecithine- en sfigomyeline-fractie kan worden opgemerkt dat ze beide een sterke base (choline) en een sterk zuur (fosforzuur) bevatten. Het IEP zal zeer dicht bij pH 7 liggen, en ze bezitten in een groot gebied rond het IEP geen ladingsoverschot (fig. 25A en fig. 25B volgens OVERBEEK en BUNGENBERG DE JONG, 1949). De dis-

Fig. 25A. Het verband tussen de pH en de dissociatie van de choline- en fosforzuurgroep van lecithine en van sfigomyeline.

Fig. 25B. Schematische weergave van het ladingsoverschot van lecithine en van sfigomyeline in het pH-gebied 2-12.

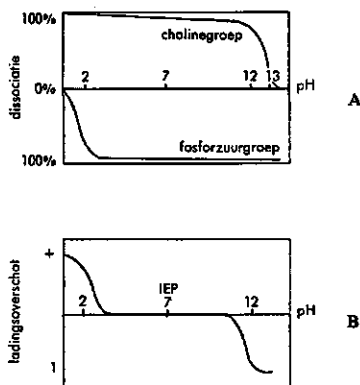


Fig. 25A. Relation between pH and the dissociation of the choline and phosphoric acid groups of lecithin and of sphingomyelin.

Fig. 25B. Diagram of the charge surplus of lecithin and of sphingomyelin in the pH-area 2-12.

sociatieconstante van de aminogroep van colamine is echter zó laag, dat slechts in betrekkelijk sterke zure media de dan verminderde lading van de fosforzuurgroep wordt gecompenseerd. Zo vonden SCHULMAN (1949) en FRASER (1957) dat cefaline ten gevolge van zijn zwakke basische eigenschappen negatief is geladen boven pH 2. Alleen cefaline is bij pH 3,8-4,0 geladen, waardoor interactie optreedt met eiwitten die bij deze pH positief zijn geladen.

Uit een onderzoek naar de penetratie van eiwit in een monomoleculaire laag van fosfatiden is gebleken dat de mate van complexvorming tussen fosfatiden en eiwit afhankelijk is van de pH. In het pH-gebied tussen de iso-elektrische punten van het eiwit en de cefaline-fractie was deze maximaal (DOTY en SCHULMAN, 1949). Men zou zich echter ook kunnen voorstellen dat de structuur van het membraan zodanig is,

dat zelfs bij een pH boven het IEP van het eiwit ( $> \text{ca. } 5$ ) de negatieve cefaline-ionen worden geadsorbeerd aan „positieve plekken” van de eiwitmoleculen.

PAYENS (1959) onderzocht de wisselwerking tussen  $\beta$ -lactoglobuline en fosfatiden. Bij pH 3,8 bleek de gemengde monomoleculaire laag sterk gecompriëerd, als gevolg van elektrostatische interacties. De berekende attracties waren echter veel geringer dan de experimenteel vastgestelde waarden. Naast elektrostatische interacties („long range forces”), moeten bij deze pH dus ook nog andere factoren werkzaam zijn, zoals waterstofbruggen en/of Van der Waals-bindingen („short range forces”).

Door de gelijktijdige aanwezigheid van eiwit en fosfatiden (cefaline) in het membraan, ligt het IEP van het melkvetbolletje lager dan dat van eiwit alleen. De pH-waarde van het IEP is afhankelijk van de verhouding eiwit/fosfatiden in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. De door PAYENS vastgestelde interactie bij pH 3,8 is in overeenstemming met de resultaten van de door MOYER (1940) uitgevoerde micro-elektroforetische experimenten. Het is duidelijk dat de cohesie en stevigheid van het membraan maximaal zijn in het IEP. Hierdoor zal de coalescentie van de vetbolletjes

Fig. 26. Het verband tussen de karntijd en de pH van gewassen room.

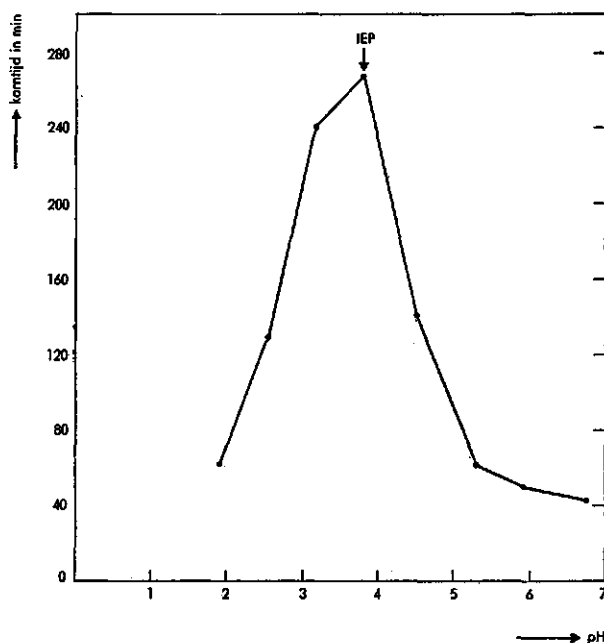


Fig. 26. Relation between churning time and pH of washed cream.

aanzienlijk worden vertraagd. Dit betekent, dat naarmate de pH van gewassen room wordt verlaagd tot 3,8, de karntijd zal moeten toenemen. Dit is in overeenstemming met de praktijkervaringen (fig. 26).

Bij de in Hfdst. III. 4.3. beschreven experimenten is naar voren gekomen dat de

zuurstofabsorptie van fosfatiden vrijwel geheel voor rekening komt van de cefalinefractie. In Hfdst. III. 4.2. werd aangetoond dat eiwit de zuurstofabsorptie van fosfatiden aanmerkelijk versnelt. Bij verlaging van de pH neemt de zuurstofabsorptie van aan eiwit gebonden fosfatiden veel sneller toe dan die van vrije fosfatiden (fig. 24A, 24B), hetgeen eveneens duidt op een interactie tussen het koperbevattende membraaneiwit met de in dit membraan aanwezige cefaline. Bij pH 3,8 is dan zowel de elektrostatische interactie als de zuurstofabsorptie van de fosfatiden (cefaline) maximaal. De snelle daling in katalytisch effect van aan eiwit gebonden koper beneden pH 3,8 zou dan wellicht moeten worden toegeschreven aan het feit dat bij verdere verlaging van de pH de binding tussen koper en eiwit snel afneemt; bij pH 2 is het koper bijna geheel in geïoniseerde vorm aanwezig.

De snelle toeneming in zuurstofabsorptie van het membraan bij lage pH loopt parallel met de organoleptische beoordeling van boter die is bereid uit gewassen room met overeenkomstige pH. In het betreffende experiment werd gewassen room met zwavelzuur aangezuurd tot de in fig. 27 aangegeven pH-waarden. Na koeling van de porties gewassen room gedurende 5 h bij 1°C, werden ze 20 h bewaard bij 15°C en vervolgens gekarnd en organoleptisch beoordeeld door een groep keurmeesters die ervaren zijn in het keuren van koelhuisboter. Daarbij werd de volgende schaal gebruikt:

- 0 = normaal
- 0→+ = spoor tranigheid
- + = licht tranig
- ++ = tranig
- +++ = sterk tranig
- ++++ = zeer sterk tranig

De in fig. 27 gegeven beoordelingen zijn het gemiddelde van de waarnemingen. Er bestaat dus een zeer nauw verband tussen de zuurstofabsorptie van het membraan bij verschillende pH-waarden en de organoleptische beoordeling van boter uit gewassen room die tot dezelfde pH-waarden is aangezuurd. Het maximum ligt in beide gevallen bij pH 3,8. Een nader onderzoek toonde aan dat de grootste intensiteit van de smaakafwijkingen (tranigheid) ligt in het pH-gebied van 3,8–3,2. Ook de TBA (Thio Barbituric Acid)-waarde (Koops, 1960a; zie ook Hfdst. VI. 5.2.) vertoonde in dit gebied een maximum. Beneden een pH-waarde van 3,8 werd een meer talkige smaak waargenomen.

Koops c.s. (1959) voerden verschillende experimenten uit met gewassen room, ten einde de invloed van de pH op de oxidatie van het membraan van de vetbolletjes na te gaan. De TBA-waarde van boter bereid uit gezuurde gewassen room steeg tot een hoge waarde, hetgeen een aanwijzing is voor de oxidatie van de onverzadigde vetzuren der membraanfosfatiden. De aanwezigheid van koper in gezuurde gewassen room was absoluut noodzakelijk om een tranige smaak te doen ontstaan. Na toevoeging van een koperbindend antioxidant trad geen tranige smaak op (zie ook 3.3.).

Fig. 27. De invloed van de pH op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal en op de organoleptische beoordeling van boter uit gewassen room.

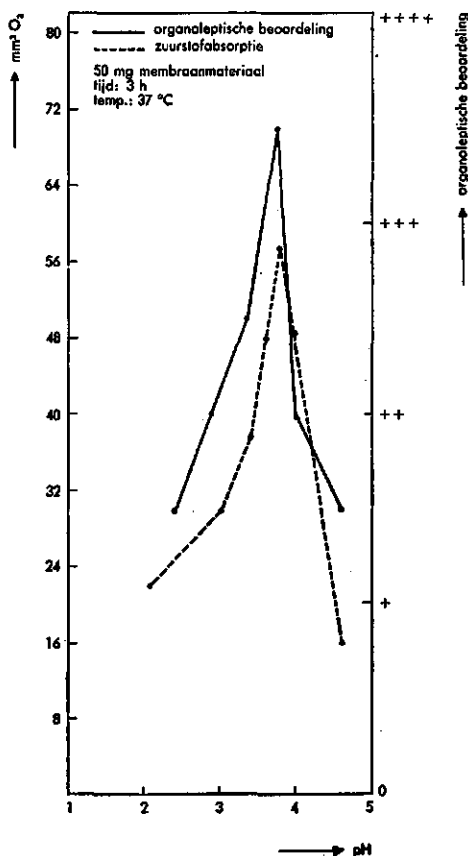


Fig. 27. The influence of pH on the oxygen consumption of the membrane material and on the organoleptic score of butter made from washed cream.

De intensiteit van het gebrek tranig van gezuurde, gewassen room met een constant gehouden pH kon worden verminderd door verhitte ondermelk, c.q. verhitte wei toe te voegen, of door de melk waarvan werd uitgegaan te homogeniseren. Als gevolg van de homogenisatie van de melk ondergaat de „bezetting” van het oppervlak van de vetbolletjes een wijziging. De hoeveelheid fosfatiden en eiwit per eenheid van vetoppervlak daalt aanzienlijk (TARASSUK en KOOPS, 1960).

De resultaten van deze experimenten leidden tot de conclusie, dat de oxidatieverschijnselen in gewassen room worden gereguleerd via de waterfase, waarbij de pH en het koper de sleutelposities innemen. Zonder de aanwezigheid van koper kon tranigheid niet worden opgewekt. In gewassen room trad bij pH 6,8 vrijwel geen oxidatie op. De veranderingen, die tengevolge van de pH-verlaging in het systeem worden teweeggebracht, zijn echter reversibel met betrekking tot de katalytische in-

vloed ervan op het ontstaan van tranigheid in boter uit gewassen room. Indien nl. de pH van gewassen room wordt verlaagd tot 3,8 en daarna wordt teruggebracht op pH 6,8, treedt geen tranigheid op.

Hoe ligt nu de situatie bij boter die is bereid uit normale (niet gewassen) gezuurde room? Bij uitsluiting van koperinfecties wordt in boter met een pH van 4,6 zelden of nooit tranigheid waargenomen. Indien nu de pH een van de regulerende factoren is, zou tranigheid in niet met koper besmette boter wellicht kunnen worden opgewekt door de pH te verlagen tot 3,8. Om de invloed van toegevoegd koper te elimineren werd voor de bereiding van de betreffende partijtjes boter de melk gewonnen en verwerkt onder uitsluiting van koperinfecties. Uit 30 kg melk werd door spontane oproming room verkregen door de melk 14 h in water van 2°C te bewaren. De ondermelk werd afgeheveld, waarna de room werd verhit tot 80°C en vervolgens onmiddellijk afgekoeld tot 5°C. Ten einde een eventuele invloed van geactiveerde SH-groepen, die bij een te intensieve verhitting worden gevormd, uit te sluiten, werd de room niet boven 80°C verhit (Koops, 1960b). Na afkoeling werd de room geënt met een zuursel. Dit zuursel werd verkregen door 500 ml van dezelfde melk na verhitting tot 80°C en een daaropvolgende afkoeling, te enten met 0,1 % zuursel en de geënte melk ca. 17 h te bewaren bij 21°C. De room werd na 2 h bewaren bij 5°C opgewarmd tot 14°C, geënt met het dik geworden zuursel en gedurende 24 h bij 14°C bewaard. Vervolgens werd ze in twee porties verdeeld. De eerste portie werd direct gekarnd, de tweede na aanzuren met zwavelzuur (p.a.) tot pH 3,80. De partijtjes boter werden gekneet, elk in drieën verdeeld en bewaard bij -10°C. Bij een ander experiment werd de gezuurde room in drie porties verdeeld. De eerste portie werd direct gekarnd, de tweede na

Tabel 15. De invloed van de pH op het ontstaan van koelhuisgebreken in niet met koper besmette boter.

Expt.nr.	pH	Beoordeling na ... maanden		
		3	6	9
1	4,67	normaal	normaal	normaal
	3,80	licht tranig	tranig	tranig
2	4,73	normaal	normaal	normaal
	3,80	licht tranig	tranig	sterk tranig
3	4,48	normaal	normaal	normaal
	3,80	tranig	sterk tranig	sterk tranig-talkig
	3,80+	normaal	normaal	normaal
	TATD 0,001%			

Table 15. The influence of pH on the development of cold storage defects in butter uncontaminated with copper.

aanzuren tot pH 3,80, de derde eveneens na aanzuren tot pH 3,80 onder toevoeging van 0,001 % TATD. De partijtjes boter werden gekeurd na resp. 3, 6 en 9 maanden (tabel 15). De boter met een normale pH was na 9 maanden nog goed van kwaliteit, die met een pH van 3,80 tranig. Toevoeging van TATD voorkwam het ontstaan van een tranige smaak. Het van nature in de boter aanwezige koper wordt door TATD gebonden en migreert als TATD-koperverbinding naar het botervet (TOLLENAAR, 1953). Het eiwitdeel van het lipoproteïnecomplex kan nu, ondanks het feit dat de fysisch-chemische voorwaarden voor oxidatie het gunstigst zijn (pH 3,80), de oxidatie van de membraanfosfatiden niet meer bevorderen. Ook dit gegeven wijst erop dat

Fig. 28. De invloed van 13 verschillende kationen op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

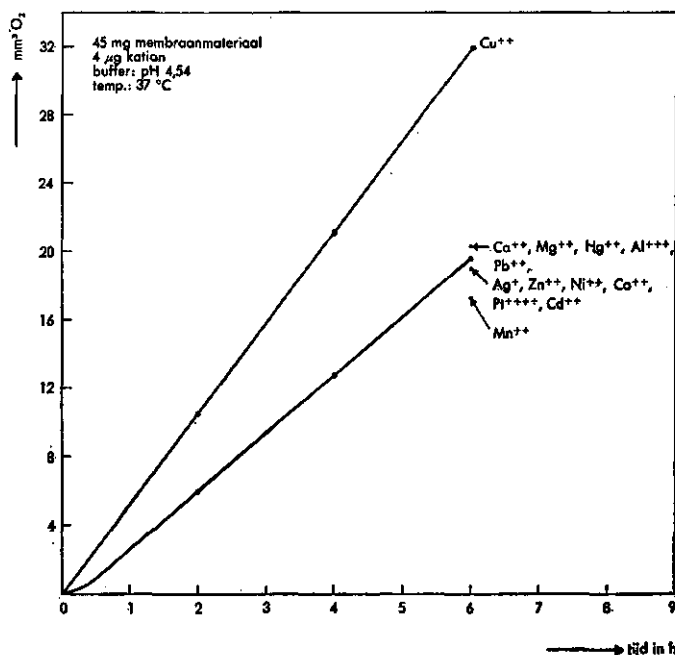


Fig. 28. The influence of 13 different cations on the oxygen consumption of the membrane material.

koelhuisgebreken in boter ontstaan door oxidatie van de membraanfosfatiden, waarbij een medium van lage pH en de aanwezigheid van koper (zowel natuurlijk als toegevoegd) de allesbeheersende factoren zijn.

### 3.3. De invloed van koper- en andere ionen

Zoals reeds is opgemerkt, heeft de toevoeging van een koperzout aan een membraansuspensie een snelle toeneming van de zuurstofabsorptie tot gevolg (fig. 22). In fig. 28 is de invloed van de toevoeging van enkele andere kationen op de zuurstofabsorptie



van het oppervlaktelaagje weergegeven. Bij de winning van de melk werden geen speciale voorzorgen getroffen om koperbesmetting te voorkomen; er werd wel steeds gewassen met kopervrij water. De navolgende kationen werden in het onderzoek betrokken:  $\text{Ca}^{++}(\text{CaCl}_2)$ ,  $\text{Mg}^{++}(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Hg}^{++}(\text{HgCl}_2)$ ,  $\text{Al}^{+++}(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Pb}^{++}((\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Ag}^+(\text{AgNO}_3)$ ,  $\text{Zn}^{++}(\text{ZnCl}_2)$ ,  $\text{Ni}^{++}(\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Co}^{++}(\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Pt}^{++++}(\text{PtCl}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Cd}^{++}(\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Mn}^{++}(\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$  en ter vergelijking eveneens  $\text{Cu}^{++}(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ .

In overeenstemming met de resultaten van de experimenten van CRESPI (1955), uitgevoerd met  $\beta$ -lipoproteïnen uit bloed, werd vastgesteld dat oxidatie van het oppervlaktelaagje alleen wordt bevorderd door koper. Mangaan remde de zuurstofabsorptie iets, hetgeen ook reeds was geconstateerd voor de oxidatie van fosfatide-solen (fig. 14). De reden waarom mangaan in beide gevallen een remmende invloed uitoefent is niet duidelijk. GARRETT (1941) nam waar dat toevoeging van mangaan aan met koper besmette melk het ontstaan van oxidatiesmaak vertraagde. Wat betreft de invloed van ijzer werd gevonden dat, indien méér werd toegevoegd dan  $0,8 \mu\text{g Fe}^{+++}/45 \text{ mg}$

Fig. 29. De invloed van koper op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal, geïsoleerd uit melk van een nieuwmelkse koe, onder uitsluiting van koperbesmetting.

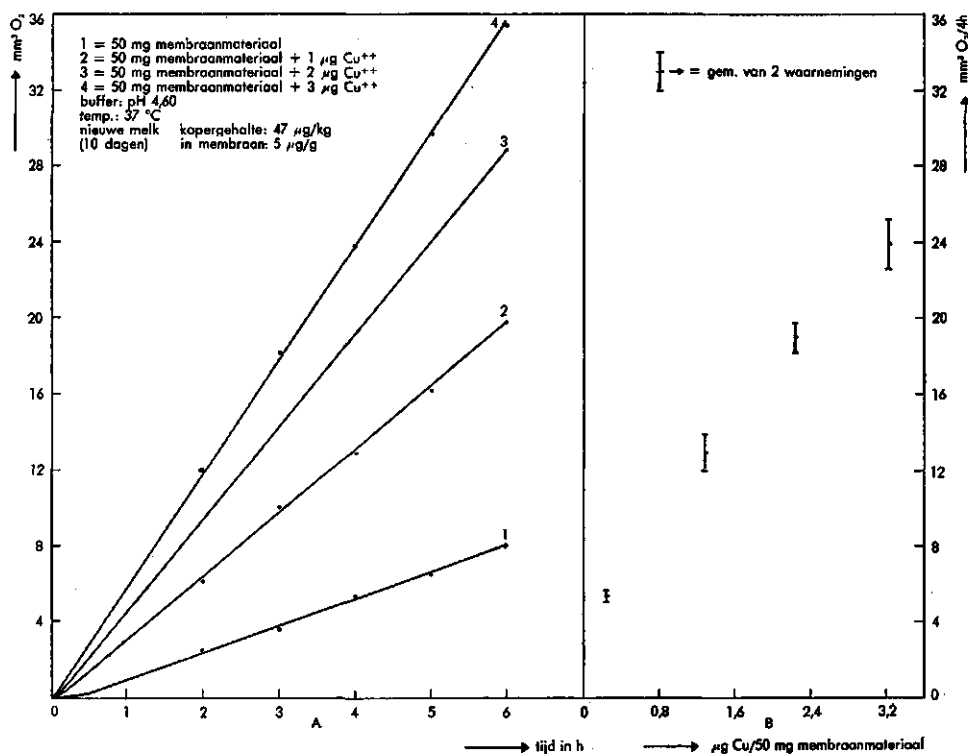


Fig. 29. The influence of copper on the oxygen consumption of the membrane material, isolated from early lactation milk not contaminated with copper.

membraanmateriaal, de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje toenam. IJzer is dus eveneens katalytisch werkzaam. In het natuurlijke milieu wordt het echter volledig geïnactiveerd door de plasmaeiwitten.

Van belang is nu te weten of er verschil is in katalytische activiteit tussen natuurlijk en toegevoegd koper. Reeds onder 3.2. werd het vermoeden uitgesproken dat de invloed van toegevoegd koper niet additief is ten opzichte van het natuurlijke koper. Ten einde deze veronderstelling te verifiëren werd nogmaals volgens de onder 3.2. vermelde wijze uit gewassen room het membraanmateriaal geïsoleerd. De hiervoor gebruikte melk was afkomstig van een „nieuwmelkse” koe (10 dagen na het begin van de lactatie). Het kopergehalte van de melk bedroeg  $47 \mu\text{g/kg}$ , het oppervlaktelaagje bevatte  $5 \mu\text{g}$  koper/g. In fig. 29A zijn de resultaten opgenomen van een aantal experimenten waarbij de zuurstofabsorptie werd bepaald van 50 mg membraanmateriaal (pH 4,60), na toevoeging van 0, 1, 2 en 3  $\mu\text{g}$  koper. Blijkbaar verloopt de toeneming in zuurstofabsorptie niet evenredig met de stijging in koperconcentratie. In fig. 29B zijn de totale koperconcentraties per 50 mg membraanmateriaal afgezet tegen de zuurstofabsorptie na 4 h. De lengten van de getrokken lijnen stellen de verschillen in zuurstofabsorptie van de duplo's voor. Een „holle curve” moet zeer onwaarschijnlijk worden geacht. De katalytische activiteit van het toegevoegde koper is dus niet groter dan die van het natuurlijke koper.

Hetzelfde experiment werd uitgevoerd met het membraanmateriaal geïsoleerd uit

Fig. 30. De invloed van koper op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal, geïsoleerd uit normale melk onder uitsluiting van koperbesmetting.

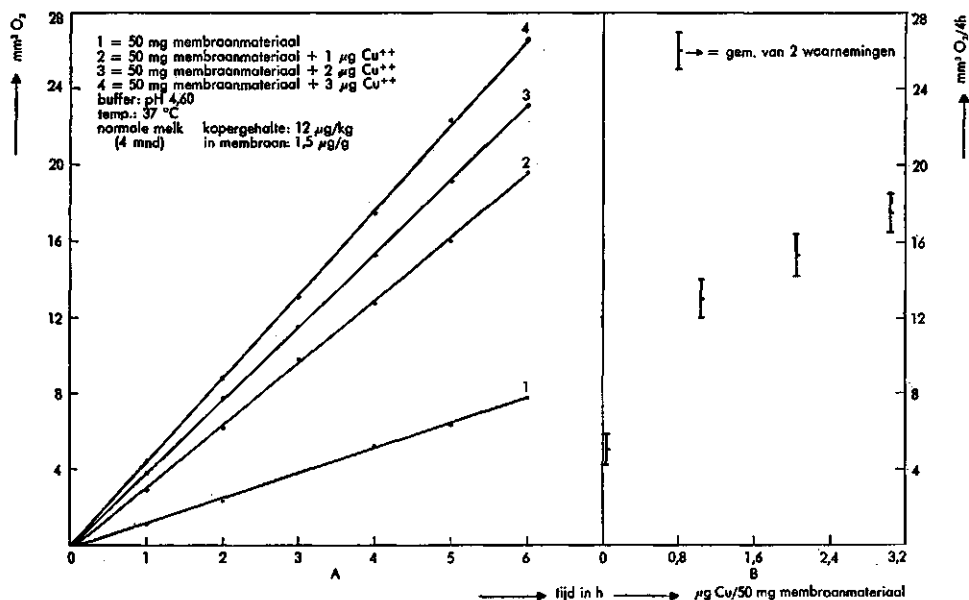


Fig. 30. The influence of copper on the oxygen consumption of the membrane material, isolated from normal milk not contaminated with copper.

Tabel 16. De invloed van koper en van de pH op het ontstaan van tranigheid in gewassen room.

Bewaartijd in dagen bij 4°C	Gewassen room									
	pH 6,68					pH 4,62				
	Toegevoegd koper (ppm)					Toegevoegd koper (ppm)				
	0	0,05	0,10	0,20	0	0,05	0,10	0,20	0,10	0,20
0	normaal	normaal	normaal	normaal	normaal	normaal	normaal	normaal	normaal	normaal
1	normaal	normaal	metaalsmaak	metaalsmaak	normaal	iets oxidatie- smaak	oxidatiesmaak	licht tranig	oxidatiesmaak	licht tranig
2	normaal	normaal	metaalsmaak	metaalsmaak	oxidatiesmaak	licht tranig	tranig	sterk tranig	tranig	sterk tranig
8	normaal	iets oxidatie- smaak	oxidatiesmaak	vettig	licht tranig	licht tranig	tranig	sterk tranig	tranig	sterk tranig

Table 16. The influence of copper and pH on the development of trainy flavour in washed cream.

melk van een „normale” koe (4 maanden na het begin van de lactatie). Het kopergehalte van de melk bedroeg 12  $\mu\text{g/kg}$ , het oppervlaktelaagje bevatte 1,5  $\mu\text{g}$  koper/g. De zuurstofabsorptie per 50 mg membraanmateriaal onder invloed van resp. 0, 1, 2 en 3  $\mu\text{g}$  toegevoegd koper, is weergegeven in fig. 30A. De lijnen in fig. 30B zijn op overeenkomstige wijze tot stand gekomen als die in fig. 29B. De verkregen resultaten stemmen in grote trekken overeen met die van het voorgaande experiment.

Indien wij nu, evenals onder 3.2. is geschied, in de drie opeenvolgende systemen (oppervlaktelaagje in gebufferde media, gewassen room (boter) en normale room (boter)) een eventuele parallel trachten door te trekken kan worden vastgesteld dat de invloed van koper in gewassen room bij normale pH ( $\pm 6,6$ ) alléén duidelijk tot uiting komt indien de gewassen room wordt verhit. Deze verhitting was bij pH 4,6 niet noodzakelijk. De resultaten van de experimenten, die tot stand zijn gekomen in samenwerking met anderen (TARASSUK c.s., 1959) en die betrekking hebben op de organoleptische eigenschappen van niet-verhitte, gewassen room welke werd bewaard bij resp. pH 6,68 en 4,62, geven hiervan een overzicht (tabel 16). De monsters gewassen room werden als volgt bereid: acht maal gewassen room (vetgehalte 34,2%) werd in twee porties verdeeld. De pH van één van de porties werd met 0,1 N NaOH op 6,68 gebracht, die van de andere porties met 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  op pH 4,62. Na toevoeging van de in de tabel aangegeven hoeveelheden koper, werden de porties room bij 4°C bewaard en na resp. 0, 1, 2 en 8 dagen organoleptisch beoordeeld. Bij pH 6,8 trad geen tranigheid op, wél werd in de monsters room waaraan koper was toegevoegd een oxidatiesmaak (soms iets vettig) waargenomen.

Indien gewassen room gedurende 10 min wordt verhit op temperaturen boven 60°C neemt de reactiesnelheid van de oxidatie echter aanzienlijk toe (zie 3.5.). Hierbij is de aanwezigheid van koper (natuurlijk en/of toegevoegd) van belang. Om koperbesmet-

Tabel 17. De invloed van koper en van antioxidanten op het ontstaan van tranigheid in verhitte gewassen room.

Toegevoegd koper		Organoleptische beoordeling		
		zonder antioxidanten	met antioxidanten	
			TATD	Quercetine Na-citraat
pH : 6,72	ppm		%	%
Vet: 23,8%			0,005	0,005
Gewassen room	—	+	0	0
„	0,08	+ → + +	0	0
„	0,16	+ + → + + +	0	0
„	0,32	+ + +	0	0

Table 17. The influence of copper and antioxidants on the development of trainy flavour in heated washed cream.

ting uit te sluiten werd voor het betreffende experiment weer uitgegaan van kopervrij gewonnen melk, waarvan de room op de aangegeven wijze achtmaal met dubbel gedestilleerd water werd gewassen en daarna gedurende 10 min verhit op 90°C. Gelijktijdig werden experimenten uitgevoerd waarbij koper en antioxidanten werden toegevoegd (tabel 17). Uit de gegevens blijkt dat het natuurlijke koper eveneens de oxidatie van de membraanfosfatiden katalyseert. TATD en quercetine remmen het ontstaan van tranigheid in verhitte, gewassen room volledig. Het koperbindend vermogen van natriumcitraat is te gering om enige invloed uit te oefenen.

Over de invloed van koper in normale room werd reeds gesproken onder Hfdst. III. 2. Geconstateerd werd dat in room waaraan geen koper was toegevoegd, het jood-additiegetal van de fosfatiden na 3 c.q. 8 dagen een daling vertoonde (tabel 8). Het is opmerkelijk dat bij de hiervoor besproken proeven de gewassen room na 8 dagen bewaring bij 4°C nog geen afwijkingen vertoonde (tabel 16), hoewel ze toch veel gevoeliger is voor oxidatie dan normale room.

Wat betreft de invloed van koper in boter uit normale room werd reeds gewezen op het feit dat bij pH 6,8 (vrijwel) nooit tranigheid voorkomt en dat dit bij pH 4,6 alleen het geval zou zijn indien toegevoegd koper aanwezig is. Dit zou wijzen op een verschil in katalytische activiteit tussen het natuurlijke en het toegevoegde koper, hetgeen niet in overeenstemming is met de resultaten van de voorgaande experimenten. Hierop zal in Hfdst. V nader worden teruggekomen.

### 3.4. De invloed van eiwitten

Bij de experimenten vermeld in Hfdst. III. 4.2. werd geconstateerd dat toevoeging van (koperbevattende) eiwitten aan fosfatide-solen de oxidatie aanzienlijk versnelt. De vraag kan nu worden gesteld in hoeverre toevoeging van plasmaeiwitten (caseïne,  $\beta$ -lactoglobuline en  $\alpha$ -lactalbumine) invloed uitoefenen op de zuurstofabsorptie van het fosfatide-eiwitcomplex (oppervlaktelaagje). De proeven die daaromtrent zijn genomen en waarbij genoemde eiwitten werden toegevoegd aan membraanmateriaal, dat was gesuspenderd in buffers van pH 4,60, gaven daarover voor wat betreft caseïne en  $\beta$ -lactoglobuline geen uitsluitsel. Voor  $\alpha$ -lactalbumine kon worden vastgesteld dat het geen invloed heeft op de zuurstofabsorptie van het complex. Toevoeging van caseïne aan het modelsysteem remde soms de zuurstofabsorptie iets. Ook werd waargenomen dat de zuurstofabsorptie van het membraan hierdoor niet werd gewijzigd. Hetzelfde geldt voor  $\beta$ -lactoglobuline.

In fig. 31 zijn de resultaten opgenomen van een experiment waarbij aan het membraanmateriaal van gewassen room, verkregen onder uitsluiting van koperbesmetting, resp. caseïne (in de vorm van natriumcaseïnaat) en  $\beta$ -lactoglobuline werden toegevoegd. Beide eiwitten werden geïsoleerd uit ondermelk volgens de voorschriften opgenomen in Biochemical Preparations (vol. I, IV). Aan 500 mg caseïne werd ca. 15 ml dubbel gedestilleerd water toegevoegd en vervolgens 0,1 N NaOH, waarbij de loog-

Fig. 31. De invloed van caseïne en van  $\beta$ -lactoglobuline op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

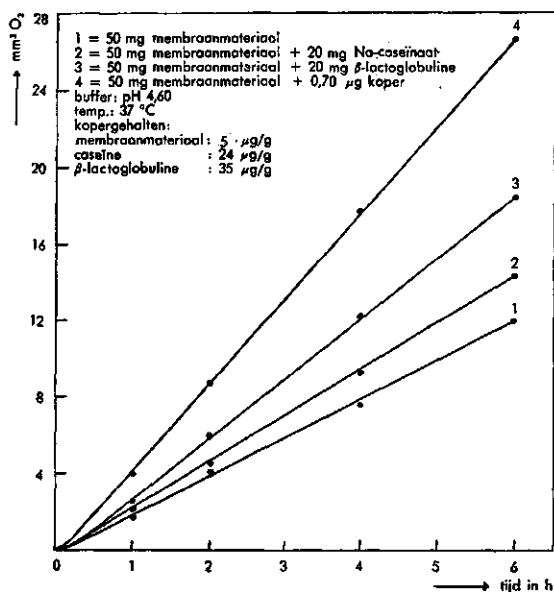


Fig. 31. The influence of casein and of  $\beta$ -lactoglobulin on the oxygen consumption of the membrane material.

toevoegingen werden gereguleerd met behulp van een op pH 6,6 ingestelde automatische titrator. Na oplossen werd met gedestilleerd water verdund tot 25 ml.  $\beta$ -lactoglobuline (500 mg) werd opgelost in 25 ml 0,05 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Uit dit experiment zou de conclusie kunnen worden getrokken dat beide eiwitten de zuurstofabsorptie van het complex bevorderen. Deze gevolgtrekking is echter niet zonder meer juist. Het aan het membraanmateriaal toegevoegde natriumcaseïnaat bevatte 24  $\mu$ g koper/g, voor  $\beta$ -lactoglobuline bedroeg dit 35  $\mu$ g koper/g; de plasma-eiwitten in melk bevatten ca. 0,5–1  $\mu$ g koper/g. Per 20 mg natriumcaseïnaat, c.q.  $\beta$ -lactoglobuline is dus resp. 0,46 en 0,68  $\mu$ g toegevoegd koper aanwezig. Bij pH 4,60 treedt echter migratie op van het toegevoegde koper naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes (Hfdst. V. 7.3.), waardoor de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje toeneemt. Door toevoeging van 0,7  $\mu$ g koper/50 mg membraanmateriaal is de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje veel groter dan die van het oppervlaktelaagje waaraan eiwit was toegevoegd. De werkelijke correctie bedraagt ong. 40% van de hiervoor genoemde hoeveelheden, overeenkomend met resp. 0,2 en 0,3  $\mu$ g koper. Ook in dat geval zal van een reële invloed van de eiwitten op de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje geen sprake zijn.

Herhaling van het experiment met een ander membraanpreparaat gaf echter niet dezelfde resultaten (fig. 32). Zowel natriumcaseïnaat als  $\beta$ -lactoglobuline remden de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje. De hoeveelheden toegevoegd plasma-

Fig. 32. De invloed van caseïne en van  $\beta$ -lactoglobuline op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

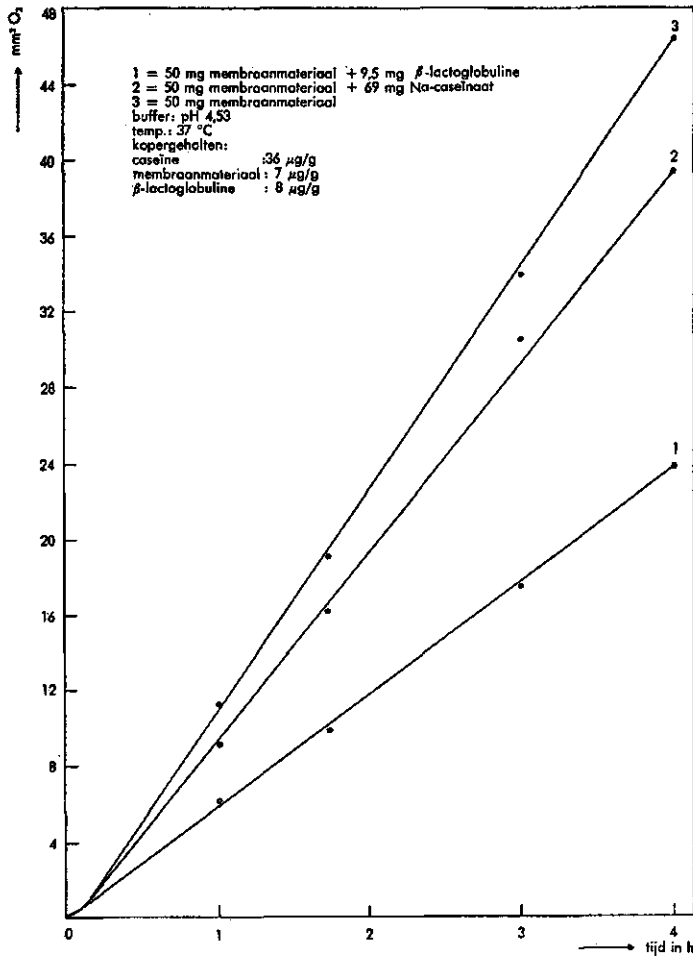


Fig. 32. The influence of casein and of  $\beta$ -lactoglobulin on the oxygen consumption of the membrane material.

eiwit waren gebaseerd op een berekening, waarbij werd aangenomen dat 1 kg boter 1 g membraaneiwit en 5 g plasmaeiwit bevat; de percentages caseïne,  $\beta$ -lactoglobuline en  $\alpha$ -lactalbume werden op resp. 80, 11 en 2,5% van de totale hoeveelheid plasmaeiwit in de melk gesteld. Het membraanpreparaat bevatte per 50 mg 17,3 mg eiwit.

LARSON en JENNESS (1950) bestudeerden uitvoerig de reducerende systemen van melk. Zij kwamen tot de conclusie dat caseïne geen reducerende eigenschappen bezit, zulks in tegenstelling tot  $\beta$ -lactoglobuline (SH-groepen). Geconstateerd werd dat de hoeveelheid reducerende groepen in  $\beta$ -lactoglobuline aanzienlijke variaties vertoonde. De remming van de zuurstofabsorptie door  $\beta$ -lactoglobuline zou in principe kunnen

berusten op de in dit eiwit aanwezige SH-groepen. SH-groepen worden echter snel geoxideerd onder invloed van koper. Mogelijk is deze factor bij de uitgevoerde experimenten van belang. Het kopergehalte van de twee  $\beta$ -lactoglobulinepreparaten verschilde nl. aanzienlijk (resp. 35 en 8  $\mu\text{g}$  koper/g).

In het volgende experiment werd nagegaan welke invloed toevoeging van laag, c.q.

Fig. 33. De invloed van laag en van hoog gepasteuriseerde ondermelk op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

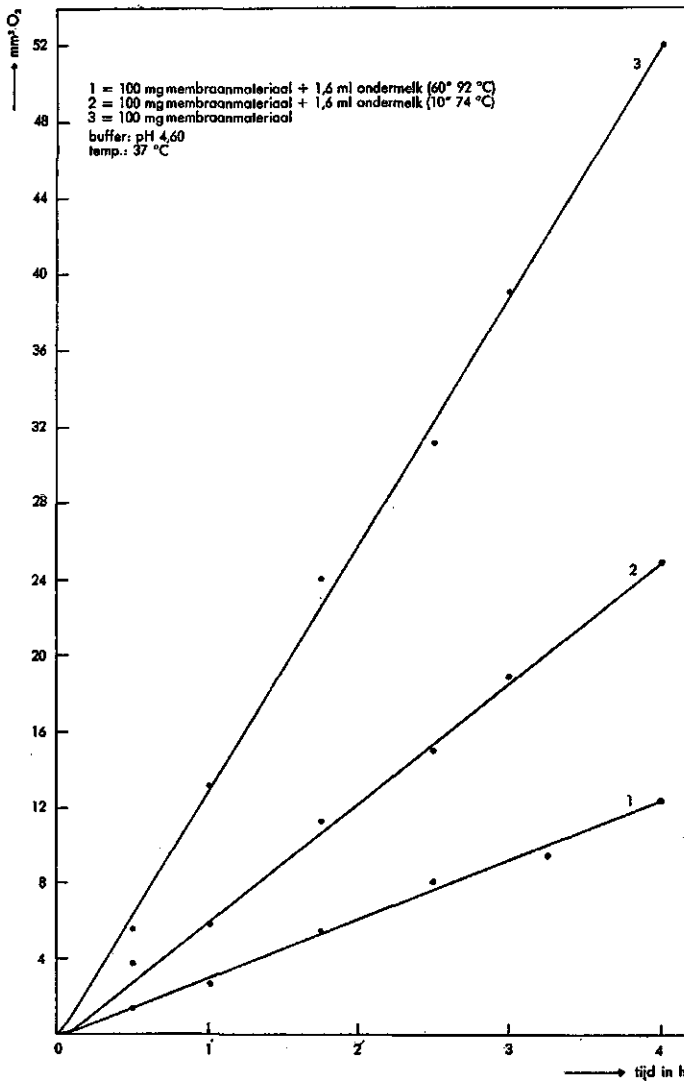


Fig. 33. The influence of low and high temperature pasteurized skim milk on the oxygen consumption of the membrane material.



hoog gepasteuriseerde ondermelk heeft op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal van gewassen room (fig. 33). De ondermelk werd met 1 N zwavelzuur (p.a.) aangezuurd tot pH 4,6 en vervolgens toegevoegd aan het gesuspendeerde oppervlaktelaagje (pH 4,60). In parallel verlopende experimenten werd de zuurstofabsorptie van de laag en hoog verhitte ondermelk vastgesteld. Uit de resultaten blijkt dat er een duidelijk verschil in remmende werking bestaat tussen laag en hoog gepasteuriseerde ondermelk, hetgeen voornamelijk moet worden toegeschreven aan de door de verhitting gevormde actieve sulfhydrylgroepen (Koors, 1960b). Toevoeging van eiwitvrije ultrafiltraten van hoog gepasteuriseerde melk, verkregen volgens een reeds eerder beschreven methode (KOOPS, 1957c), had eveneens tot gevolg dat de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje werd geremd (fig. 34). De remmende invloed van hoog

Fig. 34. De invloed van laag en van hoog gepasteuriseerde ondermelk en van ultrafiltraat op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

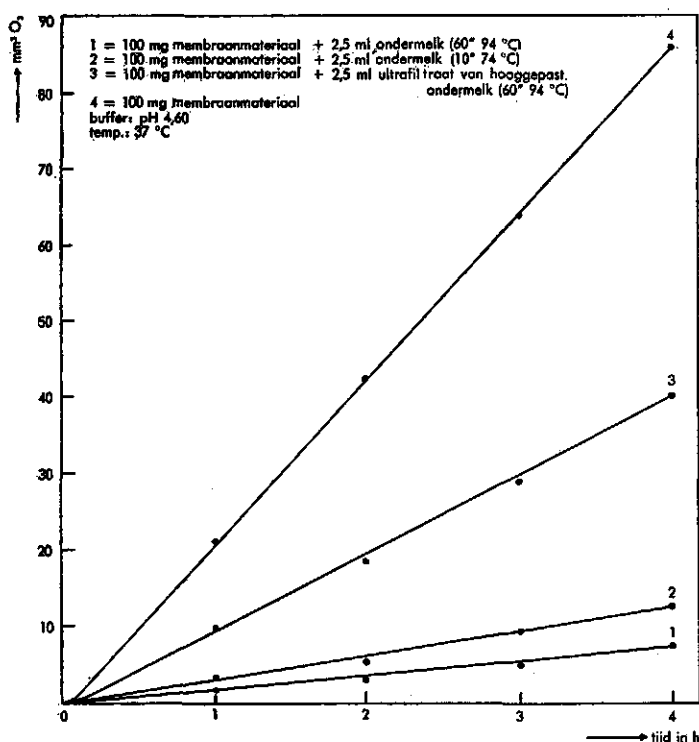


Fig. 34. The influence of low and high temperature pasteurized skim milk and of ultrafiltrate on the oxygen consumption of the membrane material.

gepasteuriseerde ondermelk berust dus niet alleen op de plasmaeiwitten, maar dient eveneens gedeeltelijk te worden toegeschreven aan niet nader geïdentificeerde verbindingen in het serum van verhitte melk.

Tenslotte werd de invloed nagegaan van hoog gepasteuriseerde ondermelk met een laag ( $30 \mu\text{g/kg}$ ) en met een hoog natuurlijk kopergehalte ( $135 \mu\text{g/kg}$ ). Per 100 mg membraanmateriaal werd 1,6 ml aangezuurde ondermelk toegevoegd. De aan de plasmaeiwitten gebonden hoeveelheid natuurlijk koper bedroeg in dit experiment dus resp. 0,05 en  $0,22 \mu\text{g}$ . De aanzienlijke daling in zuurstofabsorptie door de toevoeging van ondermelk (fig. 35) is niet afhankelijk van de aan de plasmaeiwitten gebonden

Fig. 35. De invloed van hoog gepasteuriseerde ondermelk met verschillend gehalte aan natuurlijk koper op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

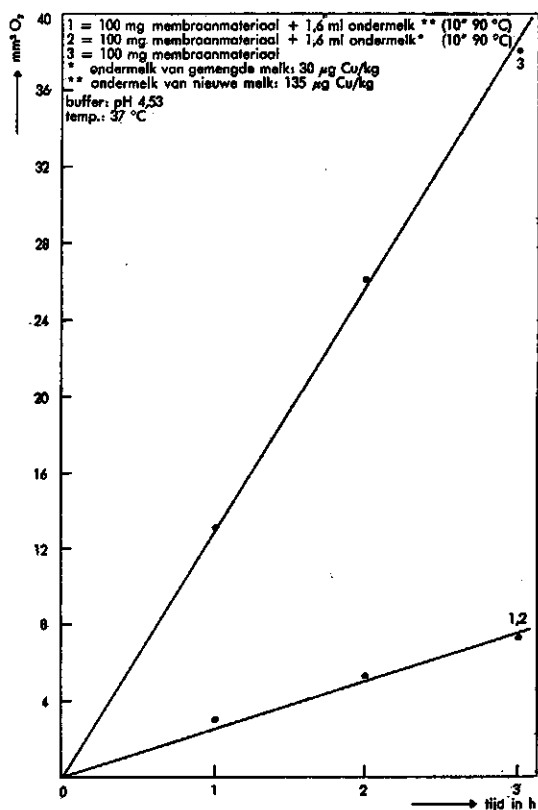


Fig. 35. The influence of high temperature pasteurized skim milk with various amounts of natural copper on the oxygen consumption of the membrane material.

hoeveelheid natuurlijk koper. In Hfdst. V. 7.2.2. zal nader worden uiteengezet dat bij verlaging van de pH ( $6,6 \rightarrow 4,6$ ) géén migratie plaats heeft van (een deel van het) aan de plasmaeiwitten gebonden natuurlijke koper naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes, zulks in tegenstelling tot het toegevoegde koper (Hfdst. V. 7.3.).

Over de invloed van toevoeging van ondermelk, c.q. wei aan gewassen room vóór

verhitting werden in samenwerking met anderen vele experimenten verricht, waarvan de resultaten elders zijn gepubliceerd (TARASSUK c.s., 1959). Indien normale room wordt verhit treedt geen tranigheid op, daarom moet het melkplasma (een) remmende verbinding(en) bevatten. Dit blijkt duidelijk als bijv. room van 30 % die resp. 0, 2, 4, 6 en 8 malen is gewassen, wordt verhit (fig. 36). De maximale smaakafwijking trad

Fig. 36. Het verband tussen het aantal malen wassen van de room en de organoleptische beoordeling alsmede de TBA-waarden van verhitte, gewassen room.

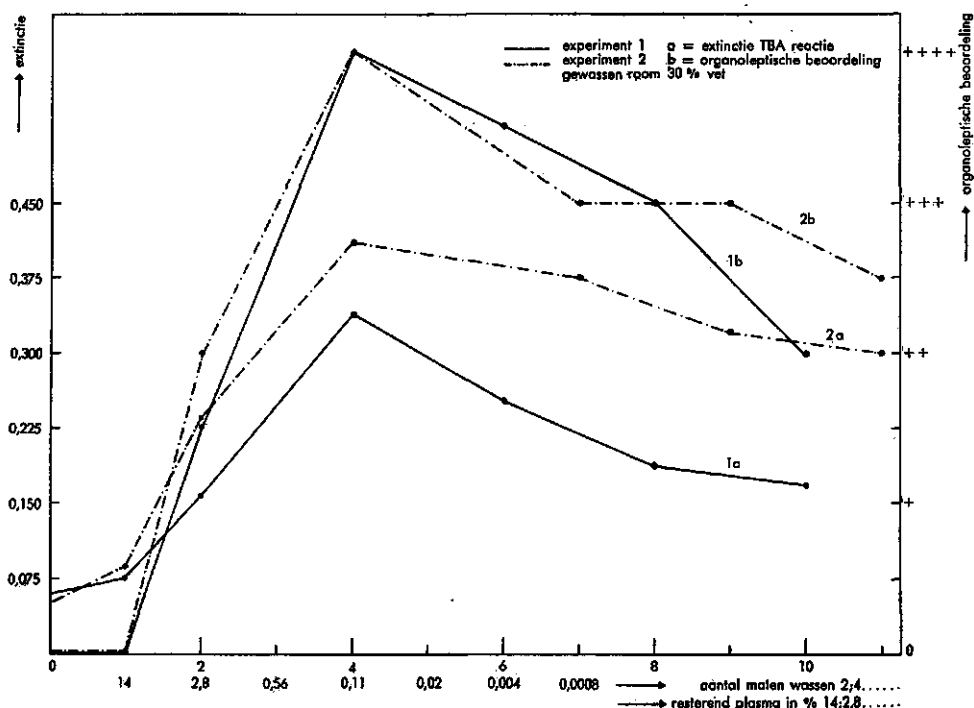


Fig. 36. Relation between the number of times the cream has been washed and the organoleptic score and the TBA-values of heated washed cream.

op na viermaal wassen. De TBA-waarden waren dan eveneens maximaal. Na viermaal wassen (met een viervoudige hoeveelheid koper vrij water) bevat de gewassen room nog ca. 0,1 % melkplasma. De voorwaarden voor oxidatie van de fosfatiden zijn in dit stadium kennelijk het gunstigst: bij voortzetting van de wasprocedure neemt de gevoeligheid voor oxidatie af. Dit vindt vermoedelijk zijn verklaring in het feit dat door het herhaaldelijk wassen te veel koperbevatend membraaneiwit wordt verwijderd. Aanvankelijk zal echter de verwijdering van het melkplasma een grotere invloed uitoefenen dan het verdwijnen van het membraaneiwit (en de fosfatiden).

Toevoeging van ondermelk aan de gewassen room vóór verhitting in concentraties

van 3-10%, gaf een geleidelijke vermindering van de intensiteit van het smaakgebrek; bij de hoogste concentratie kwam het smaakgebrek niet meer voor. Ook de TBA-waarde was in dat geval laag. Ultrafiltraten van rauwe ondermelk remden het ontstaan van het smaakgebrek niet. Bij de bespreking van de resultaten die zijn weergegeven in fig. 34 kwam naar voren, dat een ultrafiltraat van verhitte ondermelk wél een remmende invloed uitoefende op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal. In hoeverre door verhitting van ondermelk ultrafiltreerbare, reducerende verbindingen worden gevormd, werd niet nader onderzocht.

De remmende factor was ook aanwezig in lebwei en in door precipitatie van caseïne verkregen zure wei. Een toevoeging van caseïne als natriumcaseïnaat beschermde de gewassen room niet.

Daar het ontstaan van een tranige smaak in gewassen room het gevolg is van oxidatieve processen, was het aannemelijk te veronderstellen dat o.a. de bij verhitting van wei ontstane geactiveerde SH-groepen bij de remmende werking ten nauwste zijn betrokken. Deze veronderstelling was juist, want N-ethylmaleimide, een verbinding die SH-groepen blokkeert, hief de remmende werking op.

De invloed van hoog gepasteuriseerde ondermelk (c.q. wei) op de zuurstofabsorptie van de fosfatiden uit het oppervlaktelaagje en op het ontstaan van tranigheid in verhitte gewassen room is dus te herleiden tot dezelfde oorzaak, nl. het ontstaan van door verhitting uit  $\beta$ -lactoglobuline gevormde geactiveerde SH-groepen. De invloed van laag gepasteuriseerde melk (geen actieve SH-groepen) op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal bij pH 4,6 is hiermee echter niet verklaard. Daar ook rauwe wei het ontstaan van smaakgebreken in gewassen room bij pH 4,6 in geringe mate remt, zou dit wellicht kunnen berusten op een remmende invloed van de natieve SH-groepen.

Wat betreft de invloed van de plasmaeiwitten op de oxidatie in boter uit normaal gezuurde room, kan worden opgemerkt dat het wassen van de boterkorrels, waardoor het eiwitgehalte wordt verlaagd, geen invloed heeft op de houdbaarheid van de na het kneden verkregen boter. Dit lijkt in tegenspraak met de waarneming dat boter uit gewassen room (pH 4,6), die dus geen plasmaeiwitten bevat, zeer slecht houdbaar is. Men moet echter niet vergeten dat voortgezet wassen weinig eiwit meer zal verwijderen uit de boter (MULDER, 1947, deel II). Indien wij aannemen dat 1 kg boter ca.  $7/10 \times 160 = 112$  ml niet verdunde karnemelk (MULDER, 1947, deel II), ca. 2 g fosfatiden (hoofdzakelijk afkomstig uit het oppervlaktelaagje) en 1-2 g membraaneiwit bevat, is per 100 mg membraanmateriaal (afgezien van de in het membraan aanwezige triglyceriden) ca. 3 ml karnemelk aanwezig, waarvan een aanzienlijk remmende werking uitgaat (vgl. fig. 33 en 34).

De invloed van door verhitting gevormde actieve SH-groepen op de houdbaarheid van boter is in de praktijk reeds lang bekend en werd nog eens duidelijk gedemonstreerd door VAN HAEFTEN en PETTE (1953a). Overigens zijn deze factoren slechts van ondergeschikt belang, zoals uit de Hfdst. V en VI zal blijken.

### 3.5. De invloed van de temperatuur

De vraag kan worden gesteld of bij de zuurstofopneming van het membraanmateriaal de enzymatische activiteit (mede) van belang is. Het is nl. bekend dat het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes enzymen bevat, o.a. xanthine-aldehyde dehydrogenase, fosfatase en aldolase. AURAND en WOODS (1959) en AURAND c.s. (1959) concludeerden uit hun experimenten dat xanthine-oxidase zeer waarschijnlijk verantwoordelijk moet worden gesteld voor het ontstaan van de zg. spontane oxidatiesmaak.

Fig. 37. De zuurstofabsorptie van verhit en van niet-verhit membraanmateriaal.

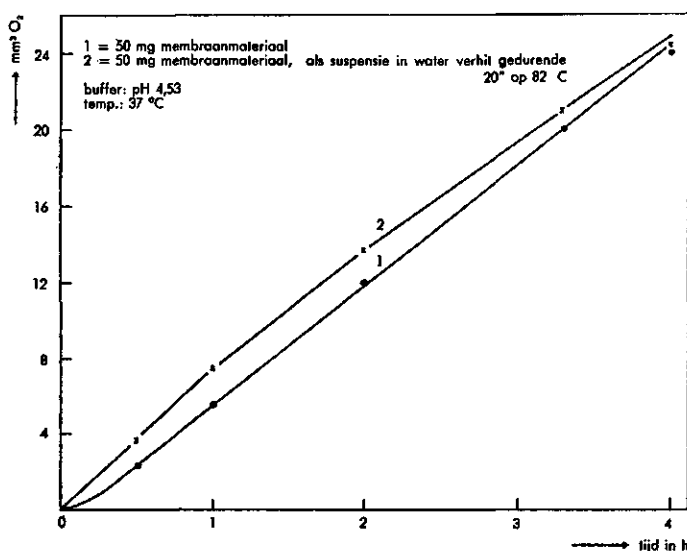


Fig. 37. The oxygen consumption of heated and unheated membrane material.

In fig. 37 zijn de resultaten weergegeven van een experiment waarbij de zuurstofabsorptie werd vergeleken van verhit en niet-verhit membraanmateriaal. Daartoe werd 300 mg van het gevriesdroogde membraanmateriaal gesuspenderd in 3 ml dubbel gedestilleerd water; 1,5 ml van deze suspensie werd in een waterbad snel opgewarmd tot 82°C, gedurende 20 sec op deze temperatuur gehouden en vervolgens snel afgekoeld. In elk Warburg-vaatje werd 0,5 ml membraansuspensie gepipetteerd, waarna 4 ml 0,1 M buffer werd toegevoegd. Uit de resultaten blijkt dat de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje niet kan worden toegeschreven aan enzymatische activiteiten.

De invloed van de temperatuur op de zuurstofopneming van het oppervlaktelaagje wordt gedemonstreerd door de resultaten die in fig. 38 zijn opgenomen. De autoxidatie werd onderzocht bij drie verschillende temperaturen, nl. bij 37, 27 en 17°C (pH 4,53). Uit deze gegevens kan de activeringsenergie ( $\approx$  activeringsenthalpie) door middel van de bekende Arrheniusvergelijking worden berekend:

Fig. 38. De invloed van de temperatuur op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

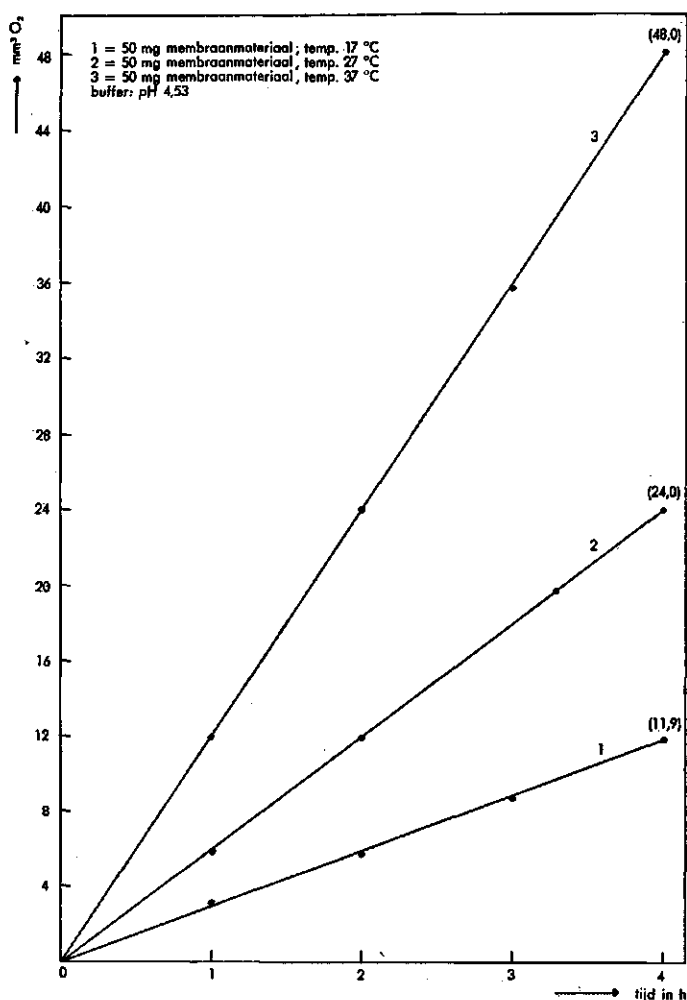


Fig. 38. The influence of temperature on the oxygen consumption of the membrane material.

Volgens Arrhenius is:

$$d \ln k / dT = E / RT^2, \quad (1)$$

waarin  $k$  de reactieconstante,  $E$  de activeringsenergie,  $R$  de gasconstante en  $T$  de absolute temperatuur is.

Na integratie van (1) volgt:

$$k = C \exp (-E/RT), \quad (2)$$

zodat de activeringsenergie kan worden bepaald uit de helling van de grafiek van  $\ln k$  tegen  $1/T$ . Met iets minder zekerheid kan volgens (2) de activeringsenergie worden

bepaald uit de vergelijking van de reactie-constanten bij twee temperaturen. Immers uit (2) volgt direct:

$$E = \frac{RT_1T_2}{(T_2 - T_1)} \ln \frac{k_2}{k_1}, \quad (3)$$

waarin  $k_1$  en  $k_2$  de reactieconstanten bij de temperaturen  $T_1$  en  $T_2$  voorstellen. In de afleiding van (2) en (3) is aangenomen dat de activeringsenergie onafhankelijk is van  $T$ . Evenzo is het (doorgaans zeer kleine) verschil tussen de reactie-energie en de reactie-enthalpie in (1) verwaarloosd.

Toepassing van verg. (3) op de proeven van fig. 38 geeft activeringsenergieën van resp. 12,8 Kcal (27–37°C) en 12,2 Kcal (17–27°C), met  $Q_{10}$  ( $k_2/k_1$ ) waarden van 2,0.

In fig. 39 A zijn de gegevens verwerkt van de zuurstofopneming van 100 mg mem-

Fig. 39. De invloed van de temperatuur en van koper op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

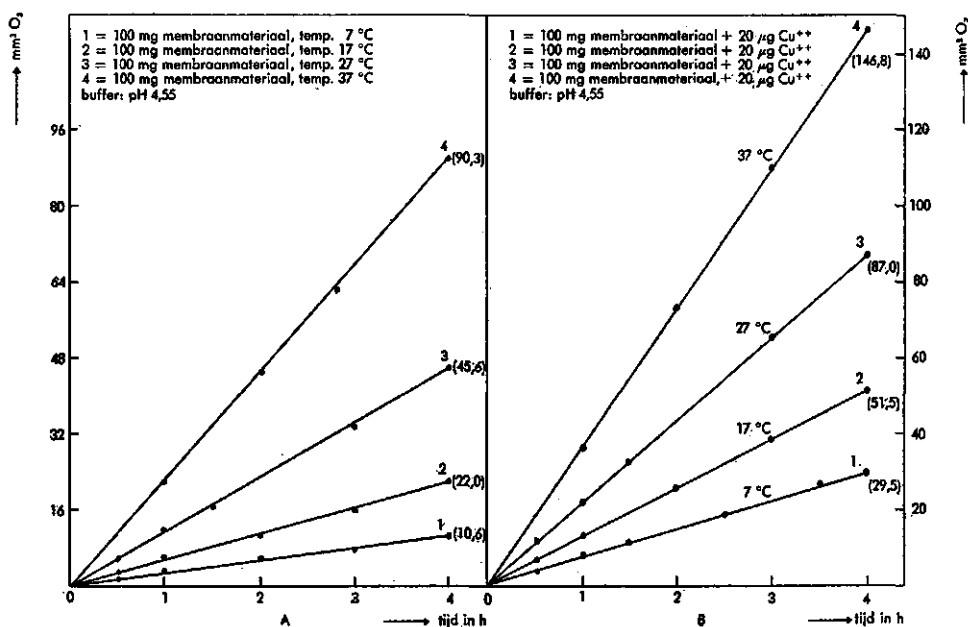


Fig. 39. The influence of temperature and copper on the oxygen consumption of the membrane material.

braanmateriaal bij pH 4,55 en temperaturen van resp. 37, 27, 17 en 7°C. Gelijktijdig werd de invloed van koper nagegaan (fig. 39 B). Het bij dit experiment gebruikte membraanpreparaat was van andere melk afkomstig dan dat bij het vorige. De activeringsenergieën en  $Q_{10}$ -waarden zijn opgenomen in tabel 18. Na toevoeging van koper wordt een daling van de activeringsenergie waargenomen. De gevonden waarden voor de activeringsenergie zijn in overeenstemming met de waarden die werden vast-

Tabel 18. De activeringsenergieën en  $Q_{10}$ -waarden van het membraanpreparaat (fig. 39A en B).

Temp. traject	Zonder koper		Met koper	
	activeringsenergie	$Q_{10}$	activeringsenergie	$Q_{10}$
°C	kcal/mol		kcal/mol	
27-37	12,6	2,0	9,7	1,7
17-27	12,5	2,1	9,1	1,7
7-17	11,8	2,1	9,0	1,7

Table 18. *Activation energies and  $Q_{10}$ -values of the membrane material (fig. 39A and B).*

gesteld voor reacties waarbij radicalen zijn betrokken (BATEMAN, 1954; WALLING, 1957; MABROUK en DUGAN, 1960).

Over het modelsysteem van gewassen room werd in het voorgaande reeds enkele malen vermeld dat, indien gewassen room wordt verhit, deze snel tranig wordt. Niet-verhitte, gewassen room had een typische volle smaak; het gebrek tranig ontstond reeds indien de gewassen room gedurende 10 min op 60°C werd verhit (tabel 19). De

Tabel 19. De invloed van verhitting op het ontstaan van tranigheid in gewassen room.

Verhit gedurende 10 min op	Expt. nr.				
	1	pH: 6,62 vet: 22,5 %	2	pH: 6,65 vet: 22,6 %	3
	geen koper	0,2 ppm koper	geen koper	0,1 ppm koper	TBA-waarde geen koper
°C					
50	0	+	0	0	0,050
60	+	+++	0 → +	+	0,060
70	++	++++	+	++ → +++	0,162
80	++++	++++	++	+++	0,195
90	++	+++	++	+++	0,220

Table 19. *The influence of heating on the development of trainy flavour in washed cream.*

smaakafwijking had de grootste intensiteit bij verhittingstemperaturen van 80-90°C. De toeneming in TBA-waarde wijst op een snelle oxidatie van de onverzadigde vet-zuren van de fosfatiden. Het ontstaan van een tranige smaak in verhitte, gewassen room kon worden voorkomen door de room te verhitten in een atmosfeer van stikstof (tabel 20). Zuurstof verhoogde de intensiteit van de smaakafwijking. De TBA-waarden komen hiermede overeen. Het is niet noodzakelijk dat het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes in de „natuurlijke toestand” aanwezig is: indien karnemelk of boter-



Tabel 20. Het ontstaan van tranigheid in gewassen room verhit onder respectievelijk lucht, stikstof en zuurstof.

Expt. nr.	1		pH: 6,65 vet: 21,6%		2		pH: 6,58 vet: 32,4%		3		TBA-waarde		Zuurstofabsorptie mm <sup>3</sup> /4 h/4 ml (in lucht) gewassen room bij 37°C
	lucht	stikstof	lucht	stikstof	lucht	stikstof	lucht	stikstof	lucht	stikstof	zuurstof	zuurstof	
A Gewassen room	+	0	0	+	+	0	+	+	0,152	0,060	0,240	8	
B Gewassen room met 0,1 ppm koper	++	0	+	0	+	0	++	++	—	—	—	16	

Table 20. Development of irainy flavour in washed cream, heated in an atmosphere of air, nitrogen and oxygen respectively.

serum van gewassen room worden verhit, ontstaat eveneens een tranige smaak. Dit kan op eenvoudige wijze worden vastgesteld, indien het verhitte serum of de verhitte karnemelk worden geschud met vers botervet en het afgecentrifugeerde vet organoleptisch wordt beoordeeld. Deze waarnemingen bevestigen nogmaals dat bij het ontstaan van het gebrek tranig het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes ten nauwste is betrokken.

Over de invloed van de temperatuur op normale room en op bij lage temperaturen bewaarde boter werd reeds gesproken in Hfdst. I. 4.6. en 4.11.).

### 3.6. De invloed van antioxidanten

#### 3.6.1. Inleiding

Het toevoegen van antioxidanten aan plantaardige en dierlijke vetten, oliën en vetbevattende voedingsmiddelen vindt steeds meer toepassing. MANNECK (1954, 1956, 1960) geeft hierover een uitgebreid literatuuroverzicht.

De antioxidanten kunnen worden ingedeeld naar de aard van hun werking: primaire antioxidanten, synergisten en metaalbinders, waarbij de scheiding tussen deze drie groepen niet strikt kan worden doorgevoerd. De primaire antioxidanten zijn verbindingen die de autoxidatie direct remmen en die zelf worden geoxideerd. Synergisten versterken de werking van de primaire antioxidanten doordat ze zich ten opzichte van deze antioxidanten als waterstofdonatoren gedragen. De invloed van de metaalbinders op het ontstaan van oxidatieve smaakgebreken is zonder meer duidelijk.

Voor een eventuele toevoeging als kunstmatige antioxidanten aan vet en vetbevattende voedingsmiddelen komen tot nu toe voornamelijk in aanmerking: galluszuren en esters hiervan (propyl-, octyl- en dodecylgallaat), nordihydroguajareetzuur (NDGA), 2-(3-) tert-butyl-4-hydroxyanisol (BHA), 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxytolueen (BHT) en tetraethylthiuramdisulfide (TADT). SJÖSTRÖM en LARSEN (1949) bereidden een „natuurlijk” antioxidant door alkalisch gemaakte wei (pH 11,0) op temperaturen van 80–95°C te verhitten. Toegevoegd aan room, zou de houdbaarheid van de daaruit bereide boter worden verbeterd. Volgens THOMÉ c.s. (1954) is hiermede inderdaad enige bescherming tegen het ontstaan van koelhuisgebreken te verkrijgen. Uit oriënterende experimenten is ons echter gebleken dat zelfs na toevoeging van vrij geringe hoeveelheden van op deze wijze verhitte wei, een duidelijke smaakafwijking viel waar te nemen. Overigens kan in dit verband niet meer van een natuurlijke antioxidant worden gesproken.

Ook aan fosfatiden, die enerzijds als zeer autoxidabele verbindingen worden aangeduid, wordt een antioxidatieve werking toegekend. SMITH c.s. (1958) onderzochten de invloed van fosfatiden op de stabiliteit van botervet bij 80°C. Dergelijke experimenten waren ook reeds verricht door EL-RAFEY c.s. (1944). Herhaalde malen werd vastgesteld dat de in het vet opgeloste fosfatiden antioxidatieve eigenschappen bezit-

ten. Volgens DUTTON (1949) moet de antioxidatieve invloed worden toegeschreven aan de cefaline-fosforzuurgroep, die als „metal scavenger” optreedt. Door toepassing van hoge temperaturen zouden de fosfatiden in staat zijn eventueel in de vetfase aanwezige sporen koper, irreversibel te binden tot een inactief complex.

De conclusies die uit deze onderzoeken werden getrokken gelden echter niet zonder meer voor boter. In voorzichtig uitgesmolten botervet komen geen fosfatiden voor. Bovendien bevat botervet geen koper.

Alhoewel aan boter geen antioxidanten mogen worden toegevoegd, zou de invloed van dergelijke verbindingen op het ontstaan van koelhuisgebreken mogelijk het inzicht in de optredende processen kunnen verdiepen.

### 3.6.2. Eigen onderzoek

De fig. 40A en 40B geven de invloed weer van een tiental antioxidanten op de zuurstofopneming van het membraanmateriaal. De invloed van TATD, dithizon, rubeaanzuur, natriumdiethyldithiocarbamaat (NaDDC) en het di-natriumzout van

Fig. 40. De invloed van tien verschillende antioxidanten op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

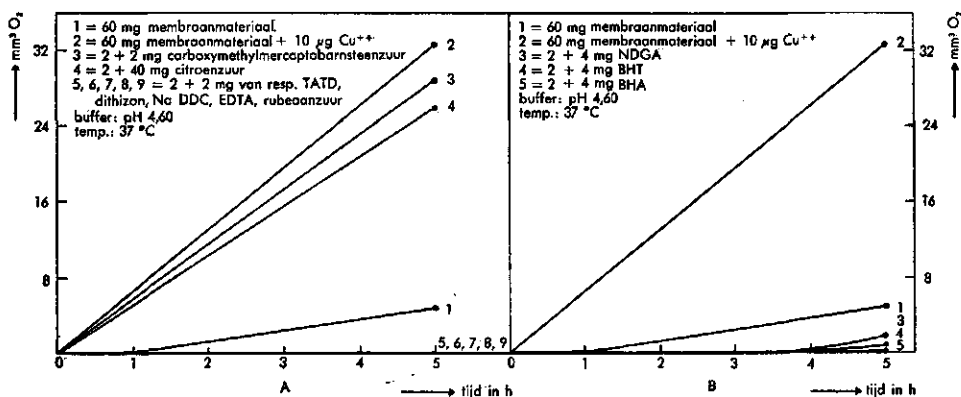


Fig. 40. The influence of ten different antioxidants on the oxygen consumption of the membrane material.

ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) (fig. 40A) berust op hun metaalbindende eigenschappen. De oxidatie van de fosfatiden van het oppervlaktelaagje komt moeilijk op gang, nu het natuurlijke en het toegevoegde koper zijn weggenomen. Kennelijk is het metaalbindend vermogen van deze verbindingen zó groot, dat ze in staat zijn het aan het eiwit van het oppervlaktelaagje gebonden koper te verwijderen. De chelatie door carboxymethylmercaptobarnsteenzuur en door citroenzuur is daartoe blijkbaar te gering. De invloed van de primaire antioxidanten NDGA, BHA en BHT komt in fig. 40B duidelijk tot uiting. Met behulp van de ascorbinezuurmethode kon worden

aangetoond dat deze antioxidanten geen koper binden. De invloed op de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje berust voor deze antioxidanten op de direct remmende werking ten opzichte van de als kettingreactie verlopende autoxidatie. Zoals uit Hfdst. VI. 4.2.3.3. zal blijken, betekent dit echter niet dat NDGA, BHA en BHT het ontstaan van koelhuisgebreken kunnen voorkomen.

De oxidatie in boter zal, zoals in het voorgaande reeds meermalen is gesteld, aanvangen bij het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. In principe kan deze oxidatie worden geremd door in vet en/of in water oplosbare antioxidanten die koper binden, zoals bijv. TATD, dithizon, rubeaanzuur (in vet oplosbaar) en NaDDC (in water oplosbaar) toe te voegen mits hun affiniteit voor koper bij pH 4,6 groter is dan die van het membraaneiwit. Dit blijkt (fig. 40A) inderdaad het geval. Een tweede voorwaarde waaraan moet worden voldaan is, dat de toegevoegde verbinding in het complexe milieu zoals boterserum is, in eerste instantie inderdaad koper bindt. Voor EDTA is dit niet het geval, daar deze verbinding ook ten opzichte van andere ionen grote affiniteit bezit (o.a. calcium). Pas na toevoeging van vrij grote hoeveelheden van deze verbinding is er sprake van een remmende invloed op het ontstaan van koelhuisgebreken. De in vet oplosbare antioxidanten NDGA, BHA en BHT, die geen koper binden, hebben geen invloed op het ontstaan van koelhuisgebreken in boter, doch remmen alleen de (secundaire) oxidatie van het botervet. Tenslotte kunnen ook in water oplosbare verbindingen door direct „afvangen” van de zuurstof het ontstaan van koelhuisgebreken in boter vertragen. Hierop zal in Hfdst. VI. 4.2. nader worden teruggekomen.

### 3.7. De invloed van diacetyl en van natriumchloride

#### 3.7.1. *Diacetyl*

In Hfdst. I. 4.4.4. werd gewezen op het onderzoek van PETTE (1949) waarbij werd vastgesteld, dat er geen correlatie bestond tussen het gehalte aan diacetyl van boter en de houdbaarheid. Indien wij het diacetylgehalte van boter op 2–10 mg/kg stellen en het gehalte aan membraanmateriaal, afgezien van de triglyceriden, op 3 g (ca. 1 g membraaneiwit en 2 g fosfatiden), bedraagt de diacetylconcentratie per 50 mg van het oppervlaktelaagje ca. 0,03–0,15 mg. Op de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje werd echter geen invloed uitgeoefend door toevoeging van resp. 0,1, 0,5 en 1,0 mg diacetyl/50 mg membraanmateriaal (fig. 41A).

#### 3.7.2. *Natriumchloride*

VAN HAEFTEN en PETTE (1953a,b) onderzochten de invloed van natriumchloride op de houdbaarheid van boter. Uit hun onderzoekingen is gebleken dat er weinig verschil

in smaak en in peroxidegetal was tussen ongezuurde en gezouten boter, bereid uit dezelfde gezuurde room (Hfdst. I. 4.9.). Gezuurde boter bevat meestal 0,7% zout, d.i. 7 g/3 g membraanmateriaal. De zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje werd na toevoeging van resp. 50, 100 en 150 mg natriumchloride/50 mg membraanmateriaal, duidelijk geremd (fig. 41B).

Fig. 41. De invloed van diacetyl en van natriumchloride op de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal.

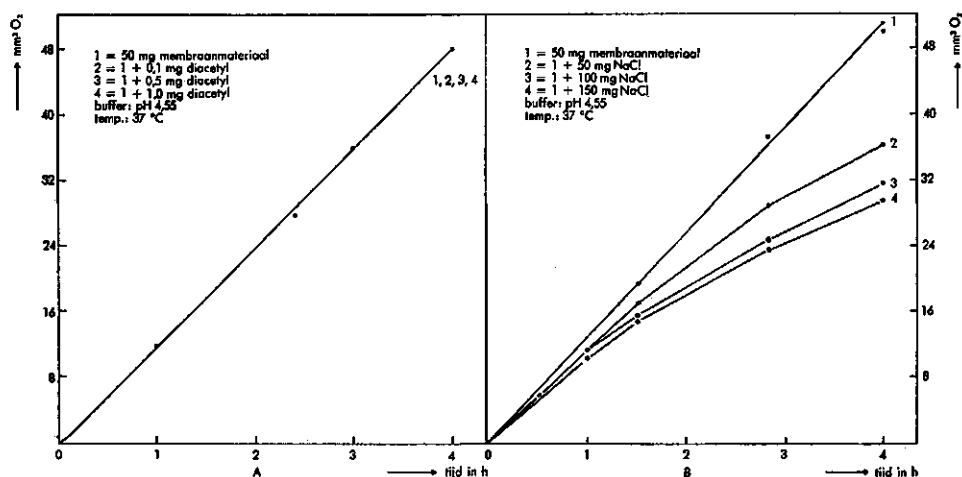


Fig. 41. The influence of diacetyl and of sodium chloride on the oxygen consumption of the membrane material.

MABROUK en DUGAN (1960) schrijven de remmende invloed van natriumchloride op de oxidatie van emulsies van methyllinoleaat toe aan de afnemende oplosbaarheid van zuurstof in buffervloeistoffen met toenemende concentraties aan natriumchloride. Het al of niet beschikbaar zijn van zuurstof zou de limiterende factor in het autoxidatieproces zijn. Uit dit experiment is niet gebleken dat de zuurstofabsorptie van het membraanmateriaal door toevoeging van zout wordt bevorderd. Er konden geen gegevens worden verkregen over een (vermeende) ongunstige invloed van dit zout op de houdbaarheid van boter.

# HET VÓÓRKOMEN VAN KOPER IN MELK, ROOM EN BOTER

## 1. INLEIDING

Hetgeen in de voorgaande hoofdstukken is vermeld heeft tot de conclusie geleid dat de oxidatieprocessen in boter worden beheerst door de pH van het boterserum en de aanwezigheid van koper. Indien het koper werd verwijderd van het membraaneiwit en het gebonden werd aan bijv. TATD, trad in de modelsystemen geen oxidatie op. Hetzelfde geldt voor boter uit gezuurde room. Een lage pH-waarde was noodzakelijk om het oxidatieproces te versnellen. Zowel het natuurlijke als het toegevoegde koper hadden een pro-oxidatieve invloed.

Uit een onderzoek van MENDER en MULDER (1957) is gebleken dat het van nature in melk aanwezige koper geen invloed uitoefent op het ontstaan van koelhuisgebreken bij boter. Een geringe toevoeging van koper verminderde de houdbaarheid echter reeds sterk. Het van nature in melk aanwezige koper kon wél actief worden gemaakt („activering”, MENDER, 1961) door de melk tot zeer lage pH-waarden aan te zuren en vervolgens weer te neutraliseren. De op deze wijze behandelde melk gaf boter met een laag gehalte aan koper, doch met een grote neiging tot bederf in het koelhuis (MENDER, 1961).

Een groot gedeelte van het aan de eiwitten gebonden koper gaat als gevolg van het aanzuren van de melk tot zeer lage pH-waarden, in ionogene vorm over; bij verhoging van de pH wordt het ionogene koper echter weer gebonden door de eiwitten. MENDER en MULDER (1957) kwamen tot de vraagstelling of het toegevoegde koper op een andere, wellicht minder „stevige” wijze aan het eiwit is gebonden dan het koper dat tijdens de vorming van de melk aan de eiwitten wordt gebonden. Door middel van opromingsproeven werd door hen aangetoond dat het toegevoegde koper voor een zeer groot gedeelte werd gebonden aan de plasmaeiwitten. Ook de hoeveelheid koper in het oppervlaktelaagje nam toe, maar naar verhouding minder dan het kopergehalte van de plasmaeiwitten.

De snelheid waarmee het oppervlaktelaagje oxideert is o.m. sterk afhankelijk van het gehalte aan koper van het membraaneiwit. Indien in melk slechts een zeer geringe hoeveelheid van het toegevoegde koper aan het oppervlaktelaagje wordt gebonden, is het niet eenvoudig antwoord te geven op de vraag waarom nu juist dit toegevoegde koper zo schadelijk is.

In het volgende is getracht hiervoor een verklaring te vinden.

## 2. DE BEPALING VAN KOPER MET BEHULP VAN NATRIUMDIETHYLDITHIOCARBAMINAAT

### 2.1. Inleiding

PYCK c.s. (1958) voegden radioactief koper toe aan organisch materiaal en bepaalden de verliezen tijdens droge destructie (verassing). Indien de verassing werd uitgevoerd bij 400°C (24 h) ging geen koper verloren, bij 500°C (12 h) bedroeg het verlies 2%; bij 700°C (6 h) en 900°C (3 h) bedroegen deze waarden resp. 13 en 42%. Bij natte destructie met salpeterzuur, zwavelzuur en perchloorzuur traden geen verliezen aan koper op, vandaar dat aan deze (snellere) methode de voorkeur wordt gegeven.

Uit het gedestrueerde organische materiaal kan het koper met een groot aantal min of meer specifieke reagentia worden geëxtraheerd. In het onderhavige onderzoek werd gebruik gemaakt van natriumdiethyldithiocarbamaat (NaDDC) dat met koperionen een gekleurde verbinding geeft die in amylacetaat wordt opgenomen en colorimetrisch wordt bepaald. Ook andere metaalionen kunnen met NaDDC gekleurde verbindingen geven. Indien aan het gedestrueerde materiaal ammoniumcitraat wordt toegevoegd, treedt bij de daaropvolgende extractie met amylacetaat van het met NaDDC gedoseerde, alkalisch gemaakte destruaat geen storing op door andere ionen. Zo voegde SCHAUMLOFFEL (1958) aan een oplossing die 10  $\mu\text{g}$   $\text{Cu}^{++}$  bevatte, 200  $\mu\text{g}$   $\text{Zn}^{++}$ , 200  $\mu\text{g}$   $\text{Pb}^{++}$ , 5 mg  $\text{Ni}^{++}$ , 5 mg  $\text{Co}^{++}$ , 50 mg  $\text{Mn}^{++}$ , 100 mg  $\text{Fe}^{+++}$ , 50  $\mu\text{g}$   $\text{Ag}^+$ , 50  $\mu\text{g}$   $\text{Hg}^{++}$  en 20  $\mu\text{g}$   $\text{Bi}^{+++}$  toe, en stelde vast dat de extinctie van de amylacetaat, na extractie van het kopercomplex, niet was verhoogd.

Het door de International Union of Pure and Applied Chemistry uitgegeven voorschrift (1959) betreffende de bepaling van koper in voedingsmiddelen is op hetzelfde principe gebaseerd. Behalve citraat wordt echter tevens het dinatriumzout van ethyleendiaminetetra-azijnzuur toegevoegd. Volgens SEDVEC en VASAK (1950) zou in dat geval alleen interferentie mogelijk zijn van bismuth en tellurium. Storing door deze metalen kan worden aangetoond door de met een organisch oplosmiddel geëxtraheerde koper-carbamaat-verbinding te behandelen met een oplossing van kaliumcyanide; bij afwezigheid van deze metalen ontkleurt het oplosmiddel geheel (ALLPORT en GARRATT, 1948).

### 2.2. Methode

De bij dit onderzoek toegepaste methode is gedeeltelijk gebaseerd op het voorschrift van PERRIN c.s. (1951) en luidt in gedetailleerde vorm als volgt:

Destructiebuizen van glas (met ingeslepen glazen stoppen) worden in het nauwe gedeelte voorzien van een merkstreep, aangevende een inhoud van 50 ml. Van het te onderzoeken monster wordt in duplo 20 g ingewogen. Naar gelang van het te onderzoeken produkt wordt als volgt te werk gegaan:

- a. melk (ondermelk en karnemelk): 20 g + 3 ml geconc.  $\text{HNO}_3$  +  $2\frac{1}{2}$  ml. geconc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;

b. room: 20 g + 8 ml geconc.  $\text{HNO}_3$ ;

c. boter: 20 g + 8 ml geconc.  $\text{HNO}_3$ .

De destructiebuizen met de monsters room, c.q. boter worden onder regelmatig zwenken gedurende 30–40 min bij  $95^\circ\text{C}$  verwarmd, ten einde het vet te wassen met het salpeterzuur. Vervolgens wordt de vetlaag van de monsters zo goed mogelijk verwijderd, waarna aan de destructiebuizen 15 ml petroleumether (kpt.  $40\text{--}60^\circ\text{C}$ ) wordt toegevoegd. Na voorzichtig omzwenken wordt de petroleumetherlaag verwijderd. Deze bewerking wordt tweemaal herhaald. Daarna wordt aan de monsters  $2\frac{1}{2}$  ml geconc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  toegevoegd. De destructie, die verder in alle gevallen op dezelfde wijze verloopt, wordt voorzichtig ingezet. Zodra de vloeistof donker wordt, worden steeds enkele druppels geconc.  $\text{HNO}_3$  toegevoegd, tot het destruaat praktisch kleurloos is geworden. Na afkoeling worden aan de inhoud van de buizen 2 ml dubbel gedestilleerd water en 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  toegevoegd, waarna gedurende een half uur wordt gekookt. Vervolgens wordt gekoeld en met dubbel gedestilleerd water aangevuld tot  $\pm 25$  ml. Na toevoeging van 4 ml van een oplossing van ammoniumcitraat en van een druppel van een 1% fenolphthaleïneoplossing wordt met geconc. ammonia geneutraliseerd tot licht-rood. Vervolgens wordt 4 ml van een oplossing van natriumdiethyldithiocarbamaat toegevoegd en wordt met dubbel gedestilleerd water aangevuld tot de streep. De buizen worden nu, na toevoeging van precies 4 ml amylacetaat, gedurende 10 min in een waterbad van  $60\text{--}65^\circ\text{C}$  verwarmd. Na driemaal intensief te zijn geschud, worden ze gedurende 2 h bij kamertemperatuur in het donker bewaard. De extinctie van de amylacetaatlaag wordt gemeten in een 1 cm-cuvet, filter S 43 (KIPP-ENGEL colorimeter), ten opzichte van gedestilleerd water.

### 2.3. Reagentia

1. Salpeterzuur: chemisch zuiver salpeterzuur (60%) wordt via een kopervrije destillatie-opzet overgedestilleerd, de voorloop wordt verwijderd.
2. Zwavelzuur: ANALAR, geconc. s.g. 1,84, 98%.
3. Petroleumether (kpt.  $40\text{--}60^\circ\text{C}$ ): overgedestilleerd via een kopervrije destillatie-opzet.
4. Waterstofperoxide: ANALAR, 30% w/v.
5. Ammoniumcitraat: M & B (R), een 50% oplossing in dubbel gedestilleerd water wordt met ammonia (25%) alkalisch gemaakt tot rood op fenolphthaleïne. Vervolgens wordt een weinig vast natriumdiethyldithiocarbamaat toegevoegd, waarna de oplossing in een waterbad wordt verwarmd tot  $50\text{--}60^\circ\text{C}$ . De oplossing wordt nu ca. tienmaal behandeld met amylacetaat. Het organische oplosmiddel mag niet meer gekleurd zijn.
6. Ammoniumhydroxide: MERCK, 25% ( $\pm 24^\circ\text{Bé}$ , s.g. 0,910).
7. Natriumdiethyldithiocarbamaat: 0,2 g NaDDC (p.a., RIEDEL de HAEN) wordt opgelost in 90 ml dubbel gedestilleerd water, waarna 10 ml ammonia (25%) wordt toegevoegd. De oplossing wordt in het donker bewaard, ze is ca. 1 week houdbaar.



8. Amylacetaat: In een destillatiekolf wordt, tezamen met 1 l amylacetaat, 15 g gegloeid watervrij natriumsulfaat gebracht, waarna wordt gedestilleerd via een kopervrije destillatie-opzet. De voorloop ( $< 136^{\circ}\text{C}$ ) wordt verwijderd.
9. Dubbel gedestilleerd water: Leidingwater wordt tweemaal via een kopervrije, continu werkende, destillatie-opzet overgedestilleerd.

### Opmerkingen

1. Glaswerk: Al het gebruikte glaswerk (incl. glasparels) wordt bewaard in salpeterzuur van 6% en vóór gebruik driemaal uitgespoeld met gedestilleerd en driemaal met dubbel gedestilleerd water.
2. Blanco's: De gemeten extincties van de blanco's bedragen meestal niet meer dan 0,030, d.i. ca.  $0,7 \mu\text{g}$  koper/50 ml. Indien deze waarde wordt overschreden verdient het aanbeveling alle chemicaliën te controleren.
3. Laboratorium: Het is raadzaam de analyse uit te voeren in een vertrek dat uitsluitend is bestemd voor micro-analyse. Het verdient aanbeveling de normale water- en gaskranen te vervangen door kranen van kunststof. Destillatie-opzetten e.d. dienen te worden beschermd tegen stof.

### 2.4. Standaardcurve voor de bepaling van koper

Op de hiervoor omschreven wijze werden de extinctiewaarden bepaald van resp. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 en  $10 \mu\text{g}$  koper. Daartoe werd bijv.  $196,48 \text{ mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (ANALAR)

Fig. 42. Standaardcurve voor koper.

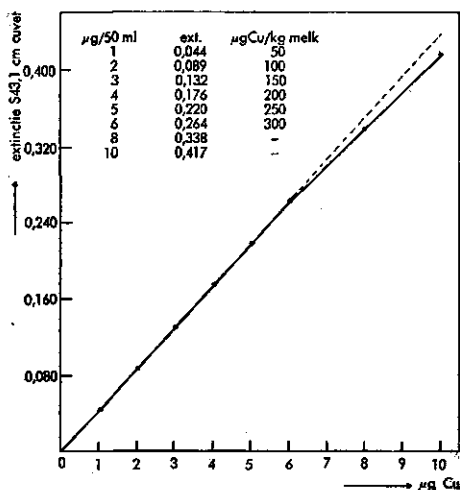


Fig. 42. Standard curve for copper.

met dubbel gedestilleerd water kwantitatief overgespoeld in een maatkolfje van 100 ml. Na toevoeging van enkele druppels 1 N zwavelzuur werd met dubbel gedestilleerd water aangevuld tot de streep. Uit deze standaardoplossing werden de benodigde verdunningen bereid, waarna op de onder 2.2. aangegeven wijze de extinctiewaarden van de hoeveelheden koper werden bepaald. Deze waarden zijn opgenomen in fig. 42, ze zijn voor de betreffende hoeveelheden koper het gemiddelde van duplowaarden van verdunningen van twee verschillende standaardoplossingen. De curve is rechtlijnig voor concentraties tot 6  $\mu\text{g}$  koper (overeenkomend met 300  $\mu\text{g}$  koper/kg melk). Bij de uitvoering van de koperbepalingen werd de extinctiewaarde van 2  $\mu\text{g}$  koper regelmatig gecontroleerd. Vrijwel alle analysesresultaten zijn via deze waarde berekend.

## 2.5. „Recovery”-experimenten en standaardafwijking

In tabel 21 zijn de resultaten verzameld van een aantal experimenten waarbij de kopergehalten (in duplo) werden bepaald van melk, room en boter zowel vóór als na toe-

Tabel 21. Het gehalte aan koper van melk, room en boter, vóór en na toevoeging van bekende hoeveelheden koper.

Produkt	Kopergehalte vóór toevoeging	Koper toegevoegd	Kopergehalte ná toevoeging	Recovery
	$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$	%
Melk	31	100	130	99
Melk	32	100	130	98
Melk	31	150	179	99
Melk	36	125	158	98
Melk	44	100	145	101
Melk	40	200	242	101
Melk	42	200	240	99
Room	144	100	243	99
Room	106	100	200	97
Room	90	200	286	99
Boter	28	160	191	102
Boter	34	100	130	97

Table 21. *Copper content of milk, cream and butter, before and after addition of known amounts of copper.*

voeging van bekende hoeveelheden koper. De gevonden kopergehalten blijken in goede overeenstemming met de berekende hoeveelheden.

Vermeldenswaard is de verbetering die optrad in de spreiding van duplowaarden, indien het aantal handelingen tot het uiterste werd beperkt. Zo werden in eerste opzet de monsters melk direct afgewogen in destructiebuizen en de monsters room en boter in centrifugebuizen. Na de verwijdering van het vet van laatstgenoemde monsters

werden ze kwantitatief overgebracht in destructiebuisen. Na destructie werden alle monsters overgebracht in maatkolffjes van 50 ml, waarna 25 ml van de inhoud van de, tot de streep aangevulde, kolffjes werd gepipetteerd in schudcilinders. In dit gedeelte werd tenslotte het kopergehalte bepaald. Het aantal uit te voeren handelingen met kans op verliezen en/of infectiemogelijkheden was groot.

De onder 2.2. beschreven methode, waarbij de gehele analyse wordt uitgevoerd in één destructiebuis, gaf blijkens de F-toets een significant lagere spreiding (significantieniveau 1 %, éézijdig), zowel voor boter (29 tegen 34 vrijheidsgraden) als voor melk (12 tegen 11 vrijheidsgraden). De standaardafwijking voor de enkele waarneming bedroeg voor melk 1,9  $\mu\text{g/kg}$  en voor boter 3,3  $\mu\text{g/kg}$ . Nadat met de verbeterde methode voldoende ervaring was verkregen, traden er geen significante verschillen meer op tussen de standaardafwijking voor melk en die voor boter. De gecombineerde standaardafwijking voor melk, room en boter bedroeg toen 1,50  $\mu\text{g/kg}$  (180 vrijheidsgraden).

### 3. HET NATUURLIJKE KOPER IN DE MELK

#### 3.1. Het kopergehalte van melk

ARCHIBALD (1958) stelt in zijn overzicht over de sporenelementen in melk het kopergehalte op  $130 \pm 30 \mu\text{g/kg}$ . Volgens MENDER en MULDER (1957) ligt het kopergehalte van melk meestal tussen 20 en 40  $\mu\text{g/kg}$ , hetgeen werd bevestigd door KING en DUNKLEY (1959). De eerstgenoemde auteurs bepaalden gedurende de gehele lactatieperiode van een aantal koeien, voor iedere koe afzonderlijk het kopergehalte van de melk. Variaties in het kopergehalte van de melk kwamen zowel voor in de melk van verschillende koeien als ook in de melk van éénzelfde koe. In het begin van de lactatieperiode werd melk verkregen met zeer hoge kopergehalten; de eerste biest had reeds een vrij hoog gehalte aan koper (50–100  $\mu\text{g/kg}$ ). Het kopergehalte steeg gedurende de eerste dagen soms tot boven 200  $\mu\text{g/kg}$ . Na het bereiken van een topwaarde daalde het geleidelijk. De maximale waarde werd soms na enkele dagen, soms pas na enkele weken bereikt. Een maand na het afkalven lag het kopergehalte van de melk meestal tussen 40–80  $\mu\text{g/kg}$ , waarna een geleidelijke daling optrad tot de normale waarde was bereikt. Individuele verschillen deden zich voor in de hoogte, de lengte en de plaats van de top, hetgeen ook was waargenomen door KOPPEJAN en MULDER (1953, fig. 43).

Indien aan koeien koperbevattende koekjes worden gevoerd, stijgt het kopergehalte van de melk niet (HARTMANS, 1960). Ook MULDER (cit. MENDER, 1961) en MENDER (1961) gelukte het niet op deze wijze invloed uit te oefenen op het kopergehalte van de melk. KING (1958) daarentegen nam waar dat een geforceerde toediening rechtstreeks in de maag („drenching”) van 10 g kopersulfaat/1 water het natuurlijke kopergehalte van de melk verhoogde. Toediening via strooien over het gras heeft bij handmelken een geringe tot zeer sterke verhoging van het kopergehalte tot gevolg, zowel

Fig. 43. Het kopergehalte van de melk van vier koeien tijdens het eerste gedeelte van de lactatieperiode (KOPPEJAN en MULDER, 1953).

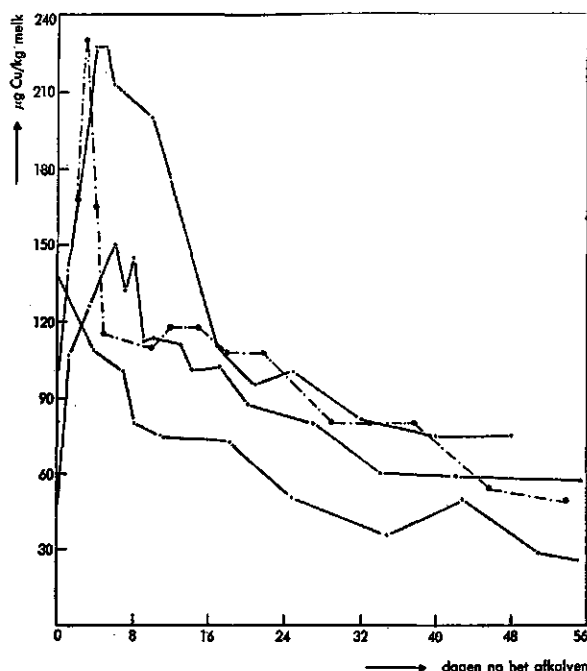


Fig. 43. Copper content of early lactation milk from four cows (KOPPEJAN and MULDER, 1953).

tijdens als na het melken; bij machinaal melken zijn de gehalten meestal niet of nauwelijks verhoogd.

### 3.2. De verdeling van het natuurlijke koper over de melkbestanddelen bij pH 6,5

#### 3.2.1. In normale melk

MENGER en MULDER (1957) gingen door middel van opromingsproeven met een groot aantal monsters melk van individuele koeien, de verdeling na van het koper over de vet- en waterfase van de melk. Representatief voor deze experimenten was melk met een kopergehalte van 48  $\mu\text{g/kg}$ . Het vetgehalte van deze melk bedroeg 3,65%. De door oproming verkregen room en ondermelk hadden kopergehalten van resp. 81 en 44,5  $\mu\text{g/kg}$  en vetgehalten van resp. 21,5 en 1,10%. De hoeveelheid koper gebonden aan de vetbolletjes bedroeg 18%; het plasma bevatte 82% van de totale hoeveelheid koper. In hun experimenten varieerde de hoeveelheid koper die aan de vetbolletjes was gebonden van 10–25%. Daar het vet geen koper bevat, moet de concentratie aan koper in het oppervlaktelaagje zeer hoog zijn.

KING c.s. (1959) injecteerden koeien met radioactief koper in de bloedbaan en stelden vast dat 10–35% van de totale hoeveelheid radioactief natuurlijk koper aan de vetbolletjes was gebonden. Dit gedeelte van het radioactieve, natuurlijke koper was vrijwel geheel gebonden aan het eiwit van het lipoproteïnecomplex. Het in het plasma aanwezige koper was naar rato over de plasmaeiwitten verdeeld. De verhouding koper/eiwit van het membraaneiwit was ca. 10–20 maal groter dan die van de plasmaeiwitten.

Uit het hiervoor gerefereerde experiment van MENDER en MULDER kan, indien het eiwitgehalte van de melk op 3,3% wordt gesteld en als 100 g vetbolletjes 1 g membraaneiwit bevatten, worden berekend dat het oppervlaktelaagje (per g eiwit) ca. 20 maal zoveel koper bevat als de plasmaeiwitten.

Naar aanleiding van deze onderzoeken werd van enkele monsters melk de verdeling van het natuurlijke koper over de vet- en waterfase bepaald. Daartoe werd melk kopervrij gewonnen, gewogen en gedurende 16 h in een glazen fles bij 4°C bewaard. Van deze melk werd ca. 200 g apart gehouden. De ondermelk werd na oproming afgehevel, de porties room en ondermelk werden gewogen en, evenals de melk, opgewarmd tot 40°C en gekoeld tot 20°C. Van de monsters melk, room en ondermelk werd zowel het kopergehalte als het vetgehalte (GERBER) bepaald. Gecontroleerd werd of de gewichts-, vet- en koperbalans correcte waarden gaven.

Tabel 22. De verdeling van het natuurlijke koper over de vet- en waterfase van de melk.

Koe Nr.	Dagen na afkalven	Gewichtsbalans	Vet		Koper		Koper	
				balans		balans	in vetbolletjes	in het oppervlaktelaagje, in % van het totaal
			g	%	g	µg/kg	µg	µg/100g
1	70	M*	1789	4,24	75,85	38,5	68,9	11,9
		R*	370	19,71	72,93	51,5	19,1	
		OM*	1415	0,20	2,83	34,5	48,8	
2	126	M	1634	3,88	63,40	10	16,3	3,9
		R	253	20,60	52,12	15	3,8	
		OM	1376	0,81	11,15	9	12,4	
3	183	M	2070	3,67	75,97	25	51,7	7,1
		R	352	18,26	64,27	32	11,3	
		OM	1716	0,73	12,53	23	39,5	
4	147	M	2416	4,02	97,12	11	26,6	6,1
		R	473	17,50	82,78	18	8,5	
		OM	1941	0,74	14,36	10	19,4	
5	225	M	2302	3,40	78,27	7,5	17,3	5,7
		R	450	16,00	72,00	14	6,3	
		OM	1849	0,46	8,51	6	11,1	

\* M = melk; R = room; OM = ondermelk.

Table 22. Partition of natural copper between the fat and water phases of milk.

Met behulp van MULDER's oproommethode (1957) werd de verdeling van het koper over de vet- en waterfase bepaald. De resultaten van vijf experimenten zijn verzameld in tabel 22. Indien wij aannemen dat het kopergehalte van melk varieert van 8–40  $\mu\text{g/kg}$  en dat  $\pm 17\%$  van de totale hoeveelheid koper in de melk is gebonden aan het oppervlaktelaagje, dan zullen bij een vetgehalte van 3,84% 100 g vetbolletjes ca. 4–18  $\mu\text{g}$  koper bevatten. Deze waarden zijn gebaseerd op de gemiddelden van die van tabel 22. MENDER en MULDER (1957) stellen het kopergehalte van melk op 20–40  $\mu\text{g/kg}$  en de hoeveelheid koper gebonden aan het oppervlaktelaagje op  $\pm 18\%$  van de totale hoeveelheid koper in de melk, hetgeen betekent dat bij een vetgehalte van 3,84%, 100 g vetbolletjes ca. 9–19  $\mu\text{g}$  koper bevatten. Mede in verband met de verdeling van het natuurlijke koper in nieuwe melk (zie 3.2.2.) is het van belang dat de gemiddelde en de maximale waarde resp. bij ca. 11 en 20  $\mu\text{g}$  koper/100 g vetbolletjes liggen.

### 3.2.2. *In nieuwe melk*

Over de verdeling van het natuurlijke koper in nieuwe melk zijn slechts enkele gegevens gepubliceerd. MULDER en KOPPEJAN (1953) onderzochten de melk van een drietal koeien op verschillende tijdstippen van de lactatie. Uit het beperkte aantal gegevens wordt de indruk verkregen dat de hoeveelheid aan de vetbolletjes gebonden koper in het begin van de lactatie geringer is dan normaal.

KING (1958) analyseerde de melk van zeven koeien waarvan drie in het begin van de lactatieperiode verkeerden en concludeerde uit dit onderzoek dat in nieuwe melk minder koper aan het oppervlaktelaagje was gebonden dan normaal het geval is.

Ten einde deze op onvoldoende gegevens gebaseerde veronderstelling nader te onderzoeken, werd de melk van een aantal nieuwmelkse koeien geanalyseerd. Ze werd betrokken van een viertal bedrijven en werd op dezelfde wijze behandeld als onder 3.2.1. is beschreven. De resultaten van deze experimenten zijn opgenomen in tabel 23, waarin ter vermijding van teveel cijfermateriaal, de vet- en koperbalansen niet zijn vermeld. Het kopergehalte van nieuwe melk blijkt aan grote variaties onderhevig, zo werden waarden gevonden van 25–214  $\mu\text{g/kg}$ . De melk van koe nr. 15 had 5 dagen na het afkalven een kopergehalte van 214  $\mu\text{g/kg}$ , het oppervlaktelaagje bevatte 29,6  $\mu\text{g}$  koper/100 g vetbolletjes. Van deze melk werd op de normale wijze, onder uitsluiting van koperinfecties, boter gemaakt. De door spontane oproming verkregen room werd opgewarmd tot 80°C en daarna onmiddellijk afgekoeld. Het zuursel werd uit dezelfde melk bereid. Na een bewaartijd van 6 maanden bij  $-10^\circ\text{C}$  was deze boter duidelijk tranig. Een belangrijke factor bij de vraag of het ontstaan van het koelhuisgebrek inderdaad is veroorzaakt door het hoge natuurlijke gehalte aan koper van het oppervlaktelaagje, is de mogelijkheid dat nieuwe melk sporen bloed bevat die een ongunstige invloed uitoefenen op de houdbaarheid van boter.

VAN DUIN (1961b) constateerde dat bloed in een concentratie van 1 : 10000 reeds schadelijk is. Zelfs 9 dagen na het afkalven kan de melk nog bloed bevatten. De bij

Tabel 23. De verdeling van het natuurlijke koper over de vet- en waterfase van nieuwe melk.

Koe Nr.	Dagen na afkalven	Kopergehalte				Vetgehalte				Kopergehalte			
		melk	room	ondermelk	melk	room	ondermelk	van de vetbolletjes	%	%	%	%	van het oppervlaktelaagje, in % v.h. totaal melk/room melk/ondermelk
		$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$	%	%	%	$\mu\text{g/100 g}$	%	%	%	%	%
1	10	47	51	45	4,32	19,23	0,24	7,3	6,8	8,6			
2	8	39,5	44,5	38	3,81	16,49	0,20	7,8	7,5	7,6			
3	6	51	51	51	4,04	17,70	0,32	5,2	4,1	4,1			
4	6	95	98	93	3,33	15,80	0,51	11,8	4,1	5,6			
5	7	116	121	115	3,96	19,90	0,54	14,6	5,0	4,9			
6	4	98	106	94	4,40	20,29	0,17	14,6	6,6	8,4			
7	5	88	96	84	6,65	20,00	1,52	14,4	10,9	12,0			
8	4	97	107	95	3,40	16,05	0,32	17,3 <sup>2)</sup>	6,1	5,6			
	8	118	133	115	3,67	20,50	0,54	20,4	6,3	6,5			
9	6	76	76,5	75	3,59	16,90	0,46	8,0	3,8	5,1			
10	3	62	62	60	5,35	21,20	0,17	6,2 <sup>2)</sup>	5,3	8,5			
	5	67,5	69	66	5,35	23,87	0,65	7,5	5,9	7,7			
	10	67	79,5	64	4,22	21,30	0,32	13,7 <sup>2)</sup>	8,7	8,8			
11	4	38	40	37	2,57	19,20	0,17	5,0 <sup>2)</sup>	3,4	5,3			
	8	45	48	44	5,18	23,40	0,54	6,1	7,1	7,6			
12	4	37	47	35	3,08	13,65	0,10	12,9	10,8	8,4			
	8	41	43	39	2,91	12,60	0,08	6,0 <sup>2)</sup>	4,4	8,0			
13	3	49	53	47	3,49	18,50	0,32	7,5	5,3	7,8			
	5	67	73	65	4,21	17,80	0,26	10,9 <sup>2)</sup>	6,9	7,3			
14	4	52	62	52	2,86	12,57	0,17	4,4	2,7	4,1			

16	5	214	223	213	4,97	15,45	0,44	29,6 <sup>1)</sup>	6,9	5,4
	4	200	190	199	3,32	19,00	0,54	13,8	2,3	4,0
17	5	180	178	180	3,30	17,00	0,46	16,6 <sup>2)</sup>	3,1	3,3
18	4	58	60	58	5,37	19,00	0,72	7,2	6,7	5,3
19	4	31	34	30	5,64	20,40	0,51	5,0	9,0	9,0
20	4	76	81	74	4,55	19,30	0,48	10,8	6,5	7,4
21	4	40	42	39	7,00	23,30	0,95	5,1	9,0	9,8
22	3	141	148	139	4,87	23,20	0,46	17,7	6,1	6,3
23	3	74	76	73	4,21	18,60	0,54	8,7	5,0	5,7
24	4	29	32	28	5,85	23,80	0,85	4,5	9,0	9,3
	2	69	73	68	4,40	22,40	0,71	9,0	5,8	5,9
	4	93	97	92	4,58	19,30	0,40	11,9 <sup>3)</sup>	5,9	5,7
25	6	140	142	139	4,19	19,60	0,38	15,2 <sup>2)</sup>	4,6	5,0
	3	35	37	34	6,20	22,70	0,66	4,6	8,3	9,1
26	7	53	59	51	4,78	22,30	0,61	8,6 <sup>2)</sup>	7,7	8,9
	4	59	66	57	4,53	20,60	0,37	10,1	7,7	8,0
27	5	25	29	24	4,22	18,80	0,56	5,1	8,8	8,8
28	4	64	74	61	5,12	25,20	0,78	11,1	8,9	10,3
29	4	87	99	84	3,75	20,65	0,44	15,5	6,7	7,5
30	6	75	81	74	4,16	24,20	0,66	10,4	5,7	5,6
31	5	89	94	88	4,29	22,80	0,74	11,5	5,5	5,6
32	6	111	119	110	4,93	26,70	0,95	14,6	6,5	6,0
33	4	64	71	62	4,18	22,40	0,22	10,1	6,6	7,2

<sup>1)</sup> Boter (pH 4,6) na 6 maanden tranig.

<sup>2)</sup> In de wiskundige bewerking met toevalscijfers uitgeloot (fig. 44, 45).

Table 23. *Partition of natural copper between the fat and water phases of early lactation milk.*



het experiment verwerkte melk was wat de kleur betreft volkomen normaal, hetgeen echter geen voldoende betrouwbare maatstaf is, daar bloedbesmettingen  $\leq 3$  ml/100 l melk geen afwijkende kleur veroorzaken.

MENGER (1961) nam waar dat zich in boter, bereid uit biest of uit zeer nieuwe melk, snel koelhuisgebreken ontwikkelden, hoewel het kopergehalte niet buitengewoon hoog was. Mogelijk is in dit verband de veelal abnormale vetzuursamenstelling van de fosfatiden mede van belang.

Fig. 44A. Histogram van de frequentieverdeling van het kopergehalte van monsters nieuwe melk.  
Fig. 44B. Histogram van de frequentieverdeling van het kopergehalte van de vetbolletjes van monsters nieuwe melk.

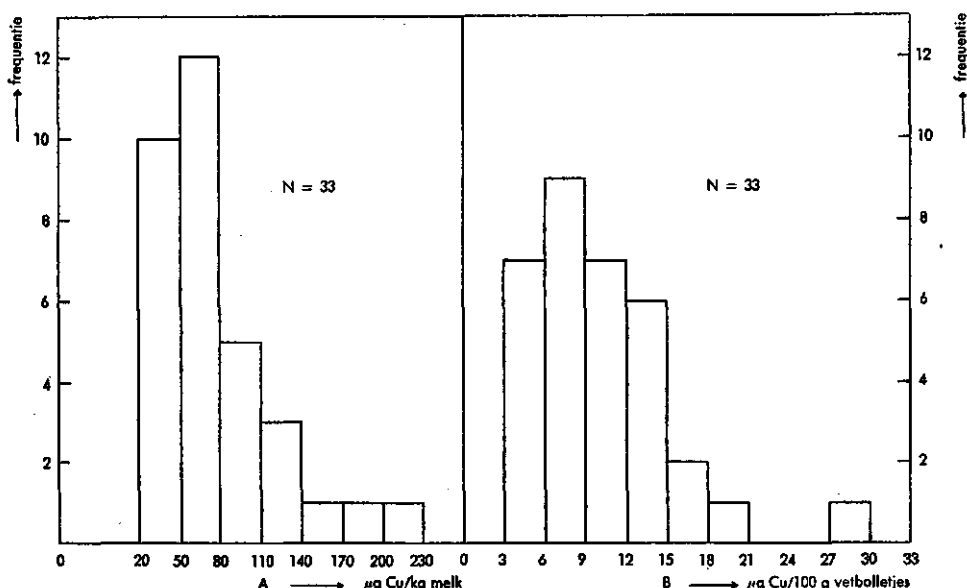


Fig. 44A. Histogram of the frequency distribution of the copper content of early lactation milk samples.  
Fig. 44B. Histogram of the frequency distribution of the copper content of fat globules from early lactation milk samples.

In de fig. 44 A en B zijn de frequentieverdelingen van resp. het kopergehalte van de melk en de hoeveelheid koper/100 g vetbolletjes als histogrammen weergegeven. Zoals uit de figuren blijkt wijken deze verdelingen sterk af van een normale en zelfs van een symmetrische verdeling. Een nader onderzoek laat zien dat een logaritmisch-normaal model bruikbaar is.

Fig. 45 stelt voor het stippendiagram van de logaritmen van de kopergehalten van de melk en van de bij deze waarden behorende gehalten aan koper van de vetbolletjes. In deze figuur zijn tevens de horizontale en de verticale mediaallijn aangegeven. Het verband tussen het kopergehalte van de melk en het gehalte aan koper van de vetbolletjes is, blijkens de grafische toets van Tukey, zeer significant ( $p < 0,01$ ).

Fig. 45. Stippendiagram van de logarithmen van de kopergehalten van monsters nieuwe melk en van de bij deze waarden behorende gehalten aan koper van de vetbolletjes.

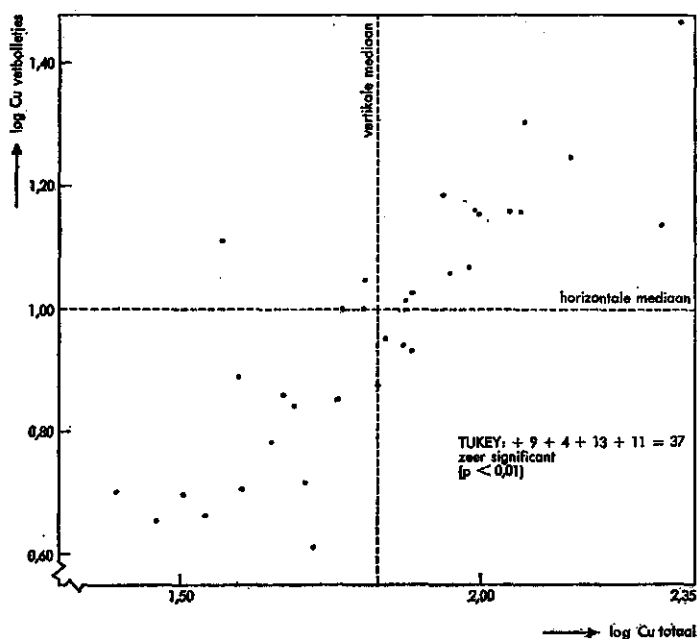


Fig. 45. Scatter diagram of the logarithms of the copper contents of early lactation milk samples and of the corresponding copper contents of the fat globules.

Over het gehalte aan koper van nieuwe melk kan worden opgemerkt, dat het logarithmisch-normale model een 95% betrouwbaarheidsinterval geeft van 23,5 tot 191  $\mu\text{g/kg}$  melk; de modus is 51,5  $\mu\text{g}$  en de verwachtingswaarde 86,5  $\mu\text{g/kg}$  melk.

Het logarithmisch-normale model geeft voor het kopergehalte van de vetbolletjes een 95% betrouwbaarheidsinterval van 3,5 tot 21,8  $\mu\text{g/100 g}$  vetbolletjes, met een modus van 7,4  $\mu\text{g}$  en een verwachtingswaarde van 11,9  $\mu\text{g/100 g}$  vetbolletjes. Gaat men uit van het cijfermateriaal zelf, dan blijkt dat het rekenkundig gemiddelde daarvan (10,5  $\mu\text{g/100 g}$  vetbolletjes) niet significant afwijkt van de gemiddelde waarde die werd vastgesteld voor normale melk (ca. 11  $\mu\text{g}$ ). Noch de modelwaarde, noch de directe waarde geven dus een significante afwijking van die van normale melk.

De snelheid waarmee het oppervlaktelaagje oxideert is voor een deel afhankelijk van de hoeveelheid koper gebonden aan het eiwit van het lipoproteïnecomplex. In boter bereid uit nieuwe en uit normale melk zal, indien verlaging van de pH tot een waarde van 4,6 geen invloed uitoefent op de verdeling van het natuurlijke koper (zie Hfdst. V. 7.2.2.), de concentratie aan koper in het oppervlaktelaagje dezelfde zijn. Dit impliceert dat boter bereid uit nieuwe melk, uit dien hoofde geen verminderde houdbaarheid behoeft te hebben.

KING (1958) stelde een onderzoek in naar de invloed van het natuurlijke koper op

het ontstaan van oxidatiesmaak in melk. Hij constateerde dat indien aan koeien „dry feed” werd verstrekt, er een duidelijke correlatie bestond tussen het natuurlijke koper in de melk ( $\pm 400$  monsters) en het optreden van spontane oxidatiesmaak. Het verschil in houdbaarheid tussen „spontaneous milk” (oxidatiesmaak zonder toevoeging van koper) en „susceptible milk” (oxidatiesmaak na toevoeging van koper), kon worden toegeschreven aan een verschil in gehalte aan koper van het oppervlaktelaagje. Toevoeging van het dinatriumzout van ethyleendiaminetetra-azijnzuur aan „spontaneous milk” voorkwam het ontstaan van oxidatiesmaak. Ook uit de resultaten van het onderzoek van SMITH en DUNKLEY (1962) blijkt dat het natuurlijke koper bij het ontstaan van oxidatiesmaak in melk ten nauwste is betrokken. Deze experimenten doen eveneens veronderstellen dat de totale concentratie aan koper in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes één van de beslissende factoren is bij het ontstaan van oxidatiegebreken.

#### 4. HET TOEGEVOEGDE KOPER IN DE MELK

##### 4.1. Inleiding

Onder 1. werd reeds vermeld, dat uit opzooiproeven van MENDER en MULDER (1957) was gebleken dat toegevoegd koper voor een zeer groot gedeelte werd gebonden aan de plasmaeiwitten. Ook de vetbolletjes (membraaneiwit) namen koper op (MENDER, 1961).

MENDER (1961) bepaalde de verdeling van het toegevoegde koper in melk door middel van de opzooimethode. KING (1958) doseerde melk met radioactief koper (sulfaat) en bepaalde de verdeling van het toegevoegde koper door de room te wassen en vervolgens de radioactiviteit te meten in de gewassen room. Beide onderzoekers stelden vast dat van het toegevoegde koper ca. 2% werd gebonden aan de vetbolletjes en constateerden tevens dat het door de vetbolletjes opgenomen koper was gebonden aan het eiwit van het lipoproteïnecomplex. De rest van het toegevoegde koper was uniform verdeeld over de plasmaeiwitten.

##### 4.2. De verdeling van het toegevoegde koper over de melkbestanddelen bij pH 6,5. Experimenten met radioactief koper\*

In aansluiting op de experimenten betreffende de verdeling van het natuurlijke koper in normale en in nieuwe melk, werd eveneens met behulp van MULDER's opzooimethode de verdeling van het toegevoegde koper in normale melk bepaald. Hiertoe werd gebruik gemaakt van radioactief koper ( $\text{Cu}^{64}\text{SO}_4$  in verdund zwavelzuur). Het

\* Onze hartelijke dank wordt betuigd aan de isotopen-afdeling van het NIZO, waar de metingen werden verricht onder leiding van Dr. Ir. J. C. de Man.

preparaat had op het moment van ontvangst een specifieke activiteit van ca. 1,6 mC/mg. De gammastraling in de monsters melk en room werd gemeten met behulp van een scintillatieteller, als detector werd gebruikt het Well-type Philips PW 4125/00. De tel- (PW 4032) – en tijd (PW 4052) apparatuur waren eveneens afkomstig van Philips, alsmede de hoogspanningsapparatuur met vóórversterker (PW 4022). Het aantal gemeten impulsen/min ( $R'_t$ ) werd gecorrigeerd voor de achtergrondtelling, waarna uit de waarde voor  $R_t$  die van het tijdstip 0 ( $R_0$ ) werd berekend:

$$R'_t = \frac{I_t}{\theta} \quad (1), R_t = \frac{I_t}{\theta} - A \quad (2) \text{ en } R_0 = R_t \cdot 2^{\frac{t_1 + \frac{1}{2}\theta}{\tau}} \quad (3)$$

waarin

$I_t$  = geteld aantal impulsen

$\theta$  = meetduur in minuten

$A$  = achtergrondtelling in impulsen/min

$t_1$  = tijdsverloop van tijd 0 tot begin van de meting in minuten

$\tau$  = halfwaardetijd van  $\text{Cu}^{64}$  in minuten (768).

De gammastraling werd gemeten in 1,5 ml van een verdunning van de melk of van de room. De monsters werden zodanig verdund, dat steeds  $4 \times 10^4$  impulsen konden worden geteld binnen een tijdsbestek van 10 min.

Het gehalte aan koper van het standaardpreparaat werd bepaald in een verdunning van de geconcentreerde oplossing van radioactief kopersulfaat; eveneens werd het aantal impulsen/min geteld. Na omrekening op tijdstip 0 werd het aantal impulsen/min/ $\mu\text{g}$  koper berekend.

In het eerste experiment werd aan 3 kg melk van 37°C ca. 300  $\mu\text{g}$  radioactief koper/kg melk toegevoegd, waarna de melk gedurende 24 h werd bewaard in water van 4°C. In de melk en in de door spontane oproming verkregen room werd bepaald: het vetgehalte volgens RÖSE-GOTTLIEB (in 2-voud), het eiwitgehalte volgens KJELDAHL (in 3-voud) en de radioactiviteit (in 2-voud). De resultaten van dit experiment zijn samengevat in tabel 24 (expt. nr. 1).

Tabel 24. De verdeling van het eiwit en van het toegevoegde radioactieve koper over de vet- en waterfase van de melk.

Expt. nr.	Produkt	Vetgehalte	Eiwitgehalte	Impulsen/min	$\text{Cu}^{64}$	Factor
		%	%	kg	$\mu\text{g/kg}$	i.p.m./ $\mu\text{g}$
1	Melk	4,60	3,81	$4,3108 \times 10^7$	299	$0,144 \times 10^6$
	Room	15,85	3,48	$3,9467 \times 10^7$	274	
2	Melk	4,60	—	$1,1680 \times 10^8$	222	$0,527 \times 10^6$
	Room	35,61	—	$0,870 \times 10^8$	165	
	Gewassen room	33,58	0,27	$18,376 \times 10^6$	35	

Table 24. Partition of protein and added radioactive copper between the fat and water phases of milk.

Uit deze gegevens kan worden berekend dat 1,3% van de totale hoeveelheid toegevoegd radioactief koper wordt gebonden aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes, hetgeen in overeenstemming is met de resultaten van KING. De hoeveelheid eiwit/100 g vetbolletjes bedroeg 970 mg, d.i. 0,45 g/kg melk. De verhouding plasma-eiwit/membraaneiwit was dus 37,65/0,45. Van de totale hoeveelheid eiwit in de melk was dus 1,2% aanwezig in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Dit maakt het zeer waarschijnlijk dat het toegevoegde koper naar rato over de melkeiwitten is verdeeld.

In het volgende experiment werd aan 30 kg van dezelfde melk (37°C) als in de voorgaande proef werd gebruikt, ca. 225  $\mu$ g radioactief koper/kg melk toegevoegd. Na centrifugeren werd de room in twee porties verdeeld, één portie werd vijfmaal met telkens een vijfvoudige hoeveelheid water gewassen, waarna de in tabel 24 (expt. nr. 2) vermelde bepalingen werden uitgevoerd. De andere portie room werd aangezuurd tot een pH-waarde van 4,6 en gedurende 2 h bij deze pH bewaard, ten einde de invloed van de pH op de verdeling van het toegevoegde koper na te gaan. Hierover zal nader worden gesproken onder 7.3.

Een berekening gebaseerd op de resp. vet- en kopergehalten van de melk en van de room, toonde aan dat ca. 2% van de totale hoeveelheid toegevoegd koper was gebonden aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. De gewassen room bevatte berekend als melk,  $4,60/33,58 \times 35 = 4,8$   $\mu$ g koper/kg, d.i. ca. 2% van de totale hoeveelheid toegevoegd koper. De door de vetbolletjes van de melk gebonden hoeveelheid toegevoegd koper kan blijken de resultaten van deze experimenten worden gesteld op 1-2% van de totale hoeveelheid toegevoegd koper, hetgeen in goede overeenstemming is met de resultaten van de experimenten van KING (1958) en van MENDER (1961).

## 5. DE BINDING VAN KOPER AAN FOSFATIDEN EN AAN EIWITTEN

### 5.1. Inleiding

Fosfatiden kunnen zich verbinden met zouten van zware metalen. Over de wijze waarop metalen worden gebonden door de fosfatiden is nog niet veel bekend. De mogelijkheid dat hierbij fosforzuurgroepen zijn betrokken moet niet uitgesloten worden geacht.

De binding van metalen aan eiwitten is biochemisch van groot belang: transport van metaalionen in het lichaam, enzymsystemen etc. Er zijn verschillende technieken ontworpen om de binding van eiwitten met metalen te bestuderen. HUGHES en KLOTZ (1954) geven hiervan een overzicht.

Volgens KLOTZ c.s. (1950) en KLOTZ en FIESS (1951) zouden cupri-ionen bij pH 4-5 worden gebonden aan de carboxylgroepen van de eiwitten; bij hogere pH's zouden N-bevattende functionele groepen van belang zijn. Bovendien kunnen koperionen worden gebonden aan sulfhydrylgroepen, zoals uit spectrofotometrische onderzoeken van KLOTZ c.s. (1952) is gebleken.

FISS en KLOTZ (1952) stelden door middel van evenwichts-dialyse vast dat de binding van koper aan  $\alpha$ -caseïne,  $\beta$ -caseïne en  $\beta$ -lactoglobuline (pH 6,5) in de genoemde volgorde afnam. De binding was praktisch onafhankelijk van temperatuurschommelingen (0–25°C) en was ook na denaturatie van het eiwit door verhitting vrijwel onveranderd gebleven. KLOTZ en CURME (1948) toonden aan dat de koperbinding aan eiwitten reversibel en pH-afhankelijk is. Bij verlaging van de pH tot een waarde van 4,0 verminderde de hoeveelheid gebonden koper belangrijk.

De invloed van de pH op de binding van koperionen aan fosfatiden en aan eiwitten werd nagegaan door middel van de oxidatie van ascorbinezuur, die specifiek wordt gekatalyseerd door zeer kleine hoeveelheden koperionen.

BARRON c.s. (1935/36) onderzochten de autoxidatie van ascorbinezuur in kopervrije oplossingen. Beneden een pH-waarde van 7,6 vond geen oxidatie plaats. De snelheid waarmede ascorbinezuur in alkalische oplossingen oxideerde nam toe naarmate de pH werd verhoogd (pH 8  $\rightarrow$  10). Indien koperionen in het milieu aanwezig waren verliep de oxidatie met een snelheid die, behalve van de pH van het milieu, eveneens afhankelijk was van de hoeveelheid koper.

Verschillende verbindingen waren in staat een complex met koper te vormen, waardoor de oxidatie van het ascorbinezuur werd geremd. DEYS en BOSMAN (1959) maakten hiervan gebruik om het koperbindend vermogen van verbindingen die in gras voorkomen te bepalen. GANDER (1955) ging op deze wijze de binding van koper aan eiwitten na, BARRON c.s. (1936) die in verschillende biologische vloeistoffen.

## 5.2. Wijze waarop de oxidatie van ascorbinezuur onder invloed van koper werd nagegaan

### 5.2.1. Manometrisch

Ten einde koperbesmetting te voorkomen is voor het verkrijgen van betrouwbare gegevens een zorgvuldige reiniging van al het benodigde glaswerk, inclusief de Warburg-vaatjes essentieel. Dit geschiedde op de reeds eerder aangegeven wijze. Ascorbinezuur (p.a.) werd vlak voor de aanvang van de experimenten opgelost in dubbel gedestilleerd water (1 g/50 ml).

De specificiteit van koper met betrekking tot de oxidatie van ascorbinezuur werd nagegaan door aan 2 mg ascorbinezuur (0,1 ml) resp. 1,9 ml buffer (tabel 14) en 4  $\mu$ g van de in fig. 46 aangegeven kationen (0,1 ml) toe te voegen. Hiervoor werden gebruikt:  $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{HgCl}_2$ ;  $\text{AgNO}_3$ ;  $\text{ZnCl}_2$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2$  en  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . De oplossing van ascorbinezuur en de buffer werden gepipetteerd in de Warburg-vaatjes en 0,1 ml van de te onderzoeken zouten in de zijarmen (blanco 0,1 ml dubbel gedestilleerd water). Na equilibratie werden de kranen gesloten en de zouten aan het hoofdcompartiment toegevoegd.

Fig. 46. De invloed van een aantal kationen op de oxidatie van ascorbinezuur.

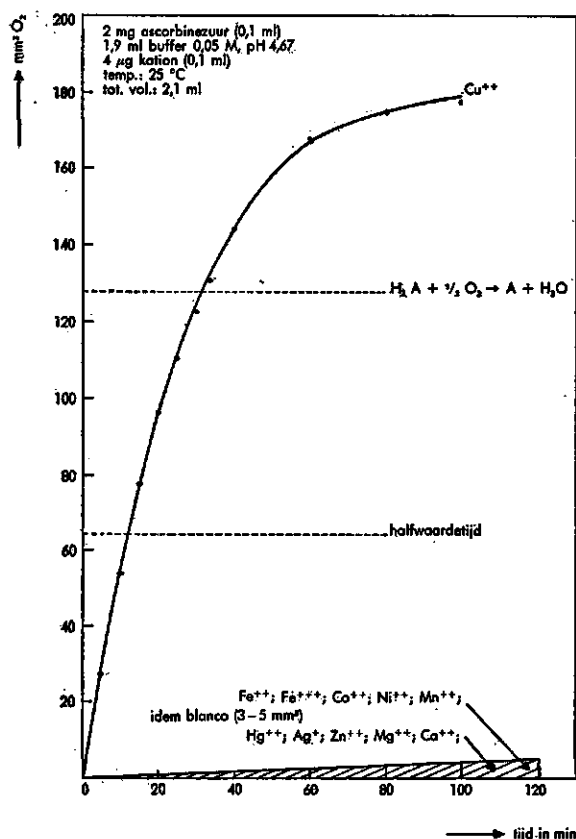


Fig. 46. The influence of a number of cations on the oxidation of ascorbic acid.

Alleen koperionen waren van invloed op de oxidatie van ascorbinezuur (fig. 46). De zuurstofabsorptie van de blanco bedroeg meestal minder dan 2% van die van de koperbevattende oplossing, die van de oplossingen waaraan de andere kationen waren toegevoegd, lagen op hetzelfde niveau als dat van de blanco. Het reactietype is aanvankelijk van de 0e orde. Nadat de helft van de hoeveelheid ascorbinezuur is verdwenen, hetgeen het geval is na een zuurstofabsorptie van 64 mm³ (0°C, 76 cm Hg), wijzigt het reactietype zich. Deze resultaten zijn in overeenstemming met die van BARRON c.s. (1936) en van GANDER (1955).

Indien nu aan een oplossing van ascorbinezuur behalve koper tevens eiwit wordt toegevoegd, wordt de omzetting tot dehydroascorbinezuur vrijwel volledig geremd (fig. 47), waarbij het geen verschil maakt of de eiwitoplossing al of niet in aanwezigheid van koper is verhit geweest (10 sec 85°C). Blijkbaar is in dit systeem de katalytische activiteit van het aan eiwit gebonden koper grotendeels verloren gegaan, zulks in tegenstelling tot de grote invloed van aan eiwit gebonden koper op de oxidatie

Fig. 47. De invloed van ei-albumine op de oxidatie van ascorbinezuur waaraan verschillende hoeveelheden koperionen zijn toegevoegd.

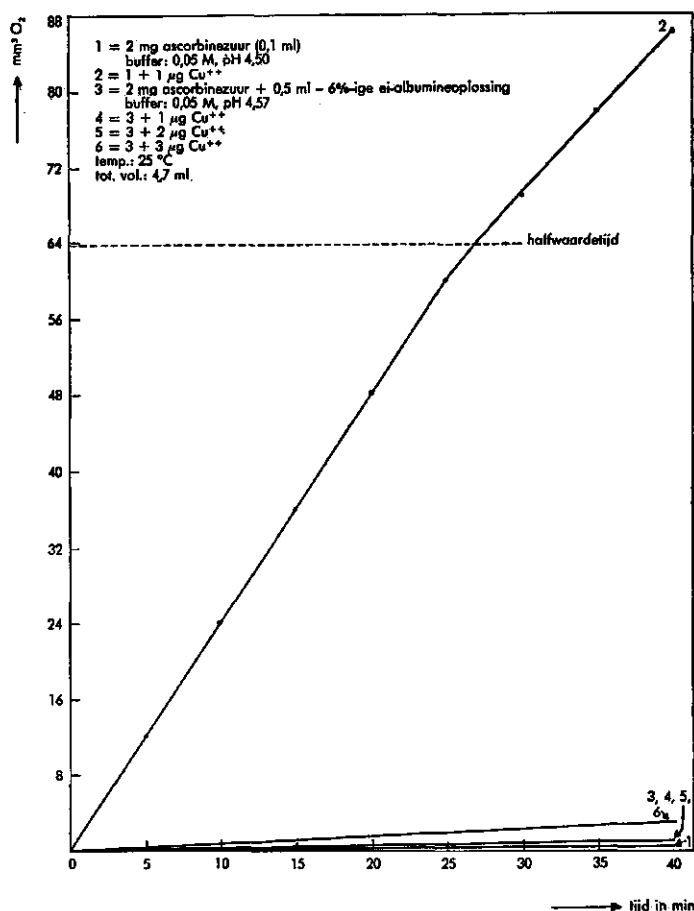


Fig. 47. The influence of egg albumin on the oxidation of ascorbic acid to which various amounts of copper ions have been added.

van lipoproteïnen. De oorzaak van het verschil in activiteit werd in het kader van dit onderzoek niet nader onderzocht.

De mate waarin de oxidatie van ascorbinezuur wordt geremd is afhankelijk van de verhouding eiwit/koper, hetgeen door de resultaten vermeld in fig. 47 en 48 wordt gedemonstreerd. Dit gegeven biedt de mogelijkheid om de binding van koperionen aan eiwitten nader te bestuderen. De proefomstandigheden dienen daartoe nauwkeurig te worden gereguleerd. In eerste instantie werd nagegaan, welke de invloed is van verschillende hoeveelheden koperionen ( $0,001-20 \mu\text{g}$ ) op de snelheid waarmee een oplossing van 2 mg ascorbinezuur (0,1 ml) oxideert bij resp. pH 6,8 en 4,6 in 0,05 M buffers en bij een temperatuur van  $37,2^\circ\text{C}$ . Het totale volume aan vloeistof in de Warburg-vaatjes bedroeg steeds 4,50 ml. De experimenten werden in duplo uit-



gevoerd, waarbij telkens, voor elke hoeveelheid koper afzonderlijk, de halfwaardetijd van het ascorbinezuur nauwkeurig werd vastgesteld. Correcties werden aangebracht voor veranderingen in de atmosferische druk, temperatuurschommelingen van het waterbad en voor de zuurstofopneming van eenzelfde ascorbinezuuroplossing zonder toevoeging van koperionen. Er werd gecontroleerd of de zuurstofopneming voor alle

Fig. 48. De invloed van verschillende hoeveelheden ei-albumine op de oxidatie van ascorbinezuur, waaraan koperionen zijn toegevoegd.

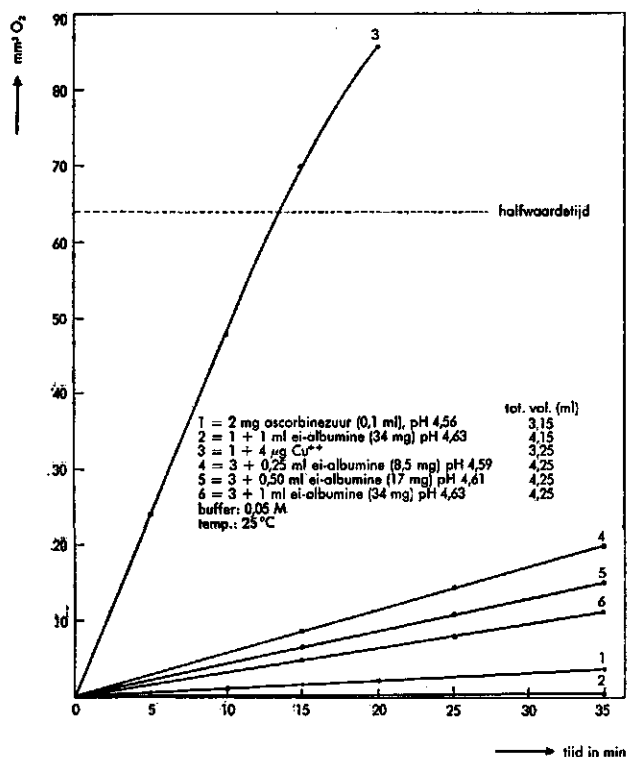


Fig. 48. The influence of various amounts of egg albumin on the oxidation of ascorbic acid to which copper ions have been added.

koperdoseringen evenredig verliep met de tijd tot de helft van het ascorbinezuur was geoxideerd.

In fig. 49 zijn de berekende halfwaardetijden uitgezet tegen de betreffende hoeveelheden koper (log.schaal). De oxidatie van ascorbinezuur onder invloed van zeer geringe koperdoseringen blijkt, in overeenstemming met gegevens uit de literatuur, bij pH 6,8 veel sneller te verlopen dan bij pH 4,6; bij toenemende concentraties neemt het verschil echter af.

Indien nu aan dit systeem onder precies dezelfde proefomstandigheden eiwit wordt toegevoegd kan uit de halfwaardetijd (pH 6,8 en 4,6) de concentratie van de vrije

koperionen en dus de hoeveelheid gebonden koper worden bepaald. Een mogelijke complicatie zou zich kunnen voordoen indien ascorbinezuur aan eiwit wordt gebonden, waardoor een gedeelte van het ascorbinezuur zou worden onttrokken aan het milieu. Volgens GANDER (1955) is dit echter niet het geval.

Fig. 49. Het verband tussen de manometrisch bepaalde halfwaardetijden van ascorbinezuuroplossingen bij respectievelijk pH 6,8 en pH 4,6 en de koperconcentraties.

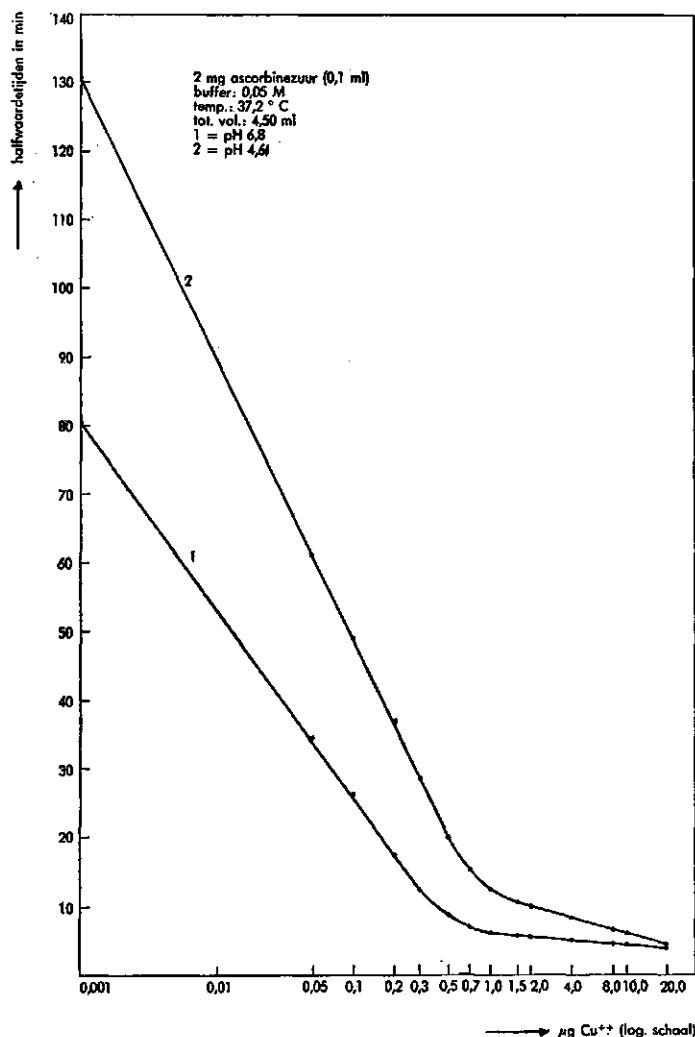


Fig. 49. Relation between the manometrically determined half oxidation times of solutions of ascorbic acid at pH 6,8 and pH 4,6 and the copper concentrations.

De onderhavige experimenten waren slechts vergelijkende onderzoeken, d.w.z. de binding van koper aan de verschillende melkeiwitten werd onder strikt vergelijkbare

omstandigheden bepaald. Niet verder onderzocht werd de maximale hoeveelheid koper die door de melkeiwitten kan worden gebonden, daar dit o.m. afhankelijk is van de soort buffer en de verhouding eiwit/koper.

### 5.2.2. Titrimetrisch

De chemische methoden ter bepaling van vit. C zijn voornamelijk gebaseerd op de reducerende eigenschappen van oplossingen van ascorbinezuur. De meest gebruikelijke wijze van bepaling berust op titratie van vit. C-bevattende oplossingen met 2,6-dichloorfenolindofenol. Daarbij kunnen andere reducerende verbindingen echter een storende invloed uitoefenen.

BARAKAT c.s. (1955) titreerden met N-broomsuccinimide; ascorbinezuur wordt om-

Fig. 50. Het verband tussen de titrimetrisch bepaalde halfwaardetijden van ascorbinezuuroplossingen bij pH 4,6 en de koperconcentraties.

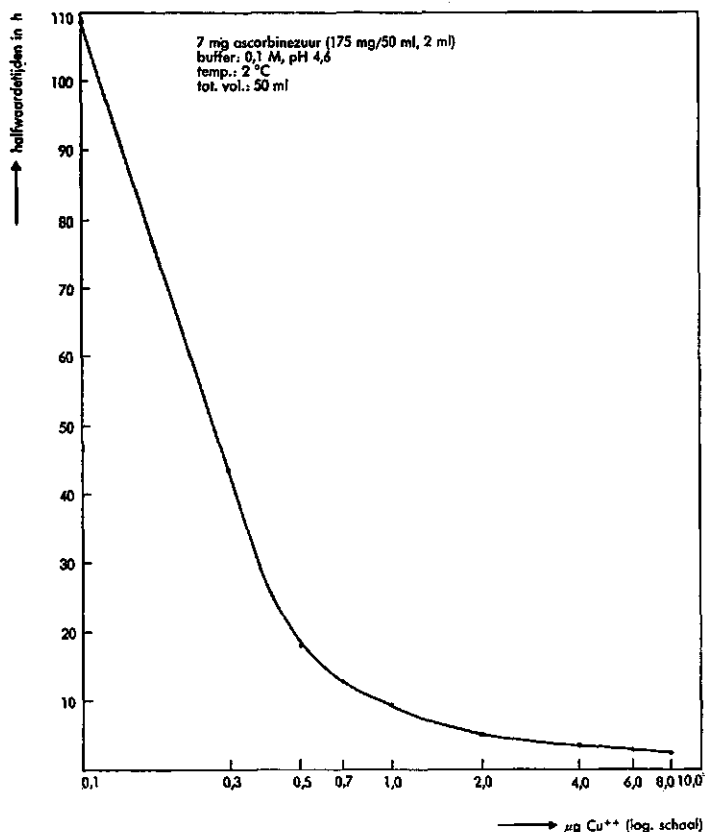


Fig. 50. Relation between the titrimetrically determined half oxidation times of solutions of ascorbic acid at pH 4,6 and the copper concentrations.

gezet in dehydroascorbinezuur en uit het reagens worden succinimide en waterstofbromide gevormd. Het eindpunt van de titratie kan worden waargenomen door een weinig KJ en stijfsel toe te voegen, waarbij jodium selectief wordt vrijgemaakt, vóórdat andere reducerende verbindingen interfereren.

In zorgvuldig gereinigde, kopervrije kolfjes (met ingeslepen glazen stoppen) werd 10 ml bifthalaat buffer (pH 4,6; 0,1 M) gepipetteerd, waarna de in fig. 50 aangegeven hoeveelheden koper werden toegevoegd (als  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Vervolgens werden de kolfjes bedeed met 35 ml dubbel gedestilleerd water, waarna de inhoud van de kolfjes werd afgekoeld tot ca. 2°C. Na toevoeging van 7 mg ascorbinezuur (175 mg/50 ml dubbel gedestilleerd water, hiervan 2 ml), werd met dubbel gedestilleerd water aangevuld tot 50 ml. De kolfjes werden onmiddellijk na het aanvullen bij 2°C mechanisch geschud, waarbij er voor werd gezorgd dat steeds voldoende zuurstof aanwezig was. Om de snelheid te bepalen waarmede het ascorbinezuur werd omgezet in dehydroascorbinezuur werd van de verschillende monsters de overgebleven hoeveelheid ascorbinezuur bepaald op de in tabel 25 aangegeven tijden. Dit geschiedde door aan

Tabel 25. Het verband tussen de titrimetrisch bepaalde halfwaardetijden van ascorbinezuuroplossingen bij pH 4,6 en de koperconcentraties.

Ascorbinezuur op tijdstip 0	Koper	Schudtijd	Ascorbinezuur na het schudden	Halfwaardetijd
mg/50 ml	µg/50 ml	h	mg/50 ml	h
6,96	0	5½	6,59	—
6,96	0,1	5	6,46	108,7
6,96	0,3	5	6,22	43,5
6,96	0,5	4	5,92	18,1
6,96	0,7	4	5,61	12,9
6,96	1,0	2½	5,79	9,8
6,96	2,0	2	5,50	5,2
6,96	4,0	2	4,74	3,3
6,96	6,0	2	4,37	2,8
6,96	8,0	2	3,76	2,3

Table 25. Relation between the titrimetrically determined half oxidation times of solutions of ascorbic acid at pH 4,6 and the copper concentrations.

de kolfjes 5 ml van een oplossing van trichloorazijnzuur (75% w/v, waarin opgelost 50 mg  $\text{HPO}_3/5$  ml) toe te voegen en vervolgens 10 ml van de kolfinhoud te titreren met 0,04% N-broomsuccinimide. De oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid ascorbinezuur werd bepaald door 10 ml van een blanco monster (zonder koper) direct bij de aanvang van het experiment te titreren. In een tweede blanco werd na 5½ h schudden de overgebleven hoeveelheid ascorbinezuur bepaald, het verschil met de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid werd in rekening gebracht bij de waarden die voor de verschillende monsters werden gevonden. De in tabel 25 samengevatte, berekende half-

waardetijden (gemiddelden van duplobepalingen) zijn in fig. 50 uitgezet tegen de resp. concentraties aan koperionen (log. schaal). Het verloop van de curve is in goede overeenstemming met die verkregen volgens de manometrische methode.

### 5.3. De binding van koper aan fosfatiden bij resp. pH 6,8 en pH 4,6

Ongeveer 1 g fosfatiden, geïsoleerd uit boter volgens de M2-methode, werd gedispergeerd in 100 ml dubbel gedestilleerd water waaraan 1 dr. toluol was toegevoegd. Van dit sol werd telkens 0,1 ml (0,93 mg fosfatiden) gepipetteerd in kopervrije Warburg-vaatjes, waarna de in fig. 51 aangegeven hoeveelheden koper werden toegevoegd. De ascorbinezuuroplossing (2 mg/0,1 ml) werd in de zijarm gebracht, het totale volume aan vloeistof werd met de resp. buffers op 4,50 ml gebracht. Na equilibratie (37,2°C) werden de kranen gesloten en het ascorbinezuur aan het hoofdcompartiment toegevoegd. Uit het, voor elke hoeveelheid koper afzonderlijk in duplo uitgevoerde experiment, werd na correctie voor de blanco-waarde, de gemiddelde halfwaardetijd berekend. Met behulp van fig. 49 kon vervolgens de hoeveelheid ionogeen koper worden bepaald.

Fig. 51. Binding van koper aan fosfatiden (manometrisch).

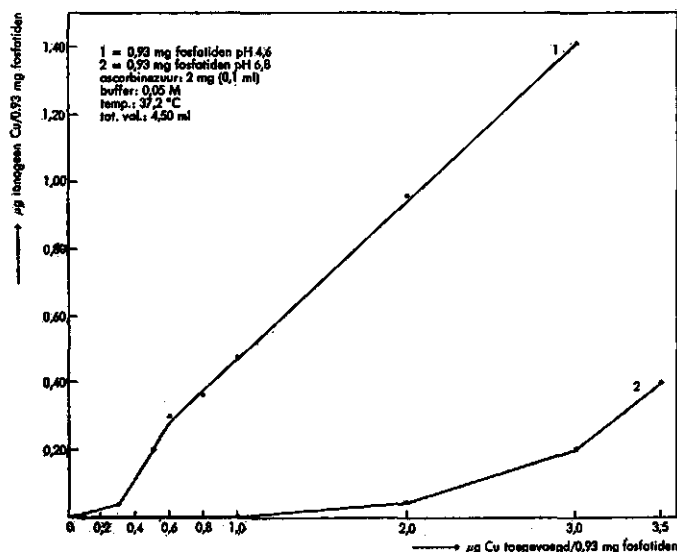


Fig. 51. Binding of copper to phospholipids (manometrically).

De resultaten van deze experimenten zijn samengevat in fig. 51. De binding van koper aan fosfatiden is afhankelijk van de pH: bij pH 4,6 is de affiniteit van de fosfatiden voor koper geringer dan bij pH 6,8. VAN DER WAARDEN daarentegen con-

cludeerde uit zijn experimenten (Hfdst. I. 7.3.), dat bij verlaging van de pH de fosfatiden méér koper binden; bij pH 4,6 was de door de fosfatiden gebonden hoeveelheid koper maximaal. De grotere gevoeligheid van boter voor oxidatie bij pH 4,6 zou volgens genoemde auteur deels hierdoor kunnen worden verklaard. De door hem voorgestane opvatting wordt echter door eerdergenoemde experimenten niet gesteund.

KING c.s. (1959) toonden aan dat het koper in het oppervlaktelaagje (zowel natuurlijk als toegevoegd) vrijwel geheel is gebonden aan het eiwit van het lipoproteïnecomplex. De hoeveelheid koper die door de fosfatiden van het oppervlaktelaagje wordt gebonden is zeer gering. Op grond van deze waarnemingen kan de veronderstelling, dat koelhuisgebreken bij boter uit gezuurde room ontstaan doordat bij pH 4,6 meer koper aan de fosfatiden van het lipoproteïnecomplex wordt gebonden, worden uitgesloten.

#### 5.4. De binding van koper aan eiwitten bij resp. pH 6,8 en pH 4,6

Op dezelfde wijze als onder 5.3. is beschreven, werd de binding van koper aan natrium-

Fig. 52. Binding van koper aan caseïne,  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine en aan het oppervlaktelaagje (manometrisch).

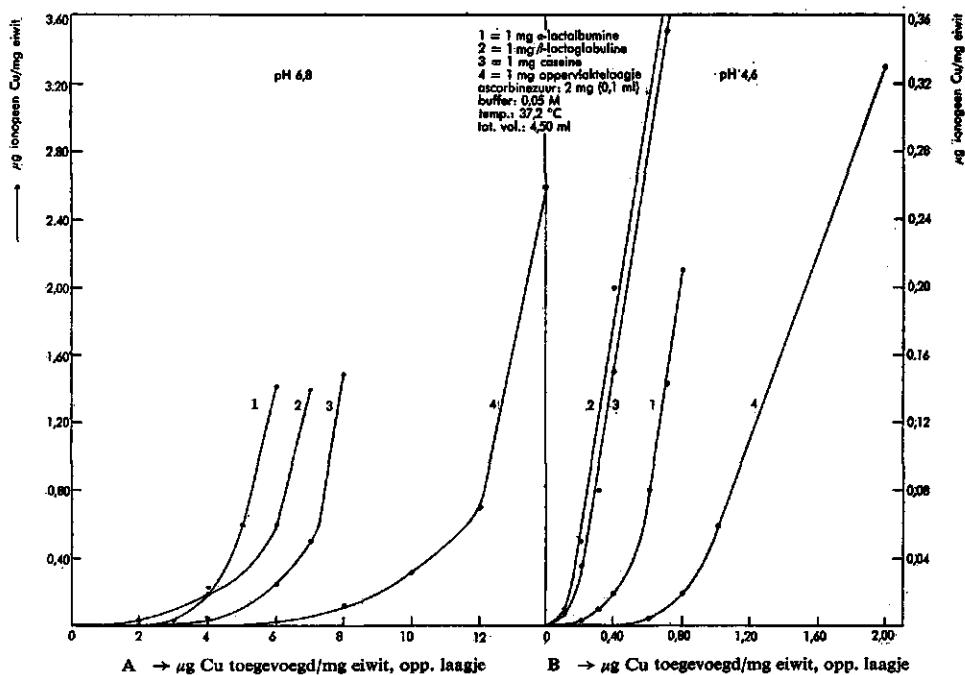


Fig. 52. Binding of copper to casein,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and to the fat globule membrane (manometrically).

caseïnaat,  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine en het oppervlaktelaagje nagegaan. Bij pH 6,8 is de affiniteit van de eiwitten voor koper zeer aanzienlijk (fig. 52A). Ze is het grootst voor het eiwit van het oppervlaktelaagje en neemt vervolgens voor natriumcaseïnaat,  $\alpha$ -lactalbumine ( $< 3 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) en  $\beta$ -lactoglobuline geleidelijk af.

Bij pH 4,6 bindt het oppervlaktelaagje wederom de grootste hoeveelheid koper, gevolgd door resp.  $\alpha$ -lactalbumine, natriumcaseïnaat en  $\beta$ -lactoglobuline (fig. 52B). Het is opmerkelijk dat bij pH 4,6 het oppervlaktelaagje in staat is ca.  $0,4 \mu\text{g}$  koper/mg kwantitatief te binden. De plasmaeiwitten nemen van het toegevoegde koper slechts een gedeelte op.

Er moet echter nogmaals op worden gewezen dat de onder 5.3. en 5.4. beschreven experimenten, waarvan de resultaten zijn samengevat in de fig. 51 en 52, niet pretenderen het kwantitatieve aspect van de binding van koper aan fosfatiden en aan ei-

Fig. 53. Ionogeen koper in boterserum na toevoeging van kopersulfaat.

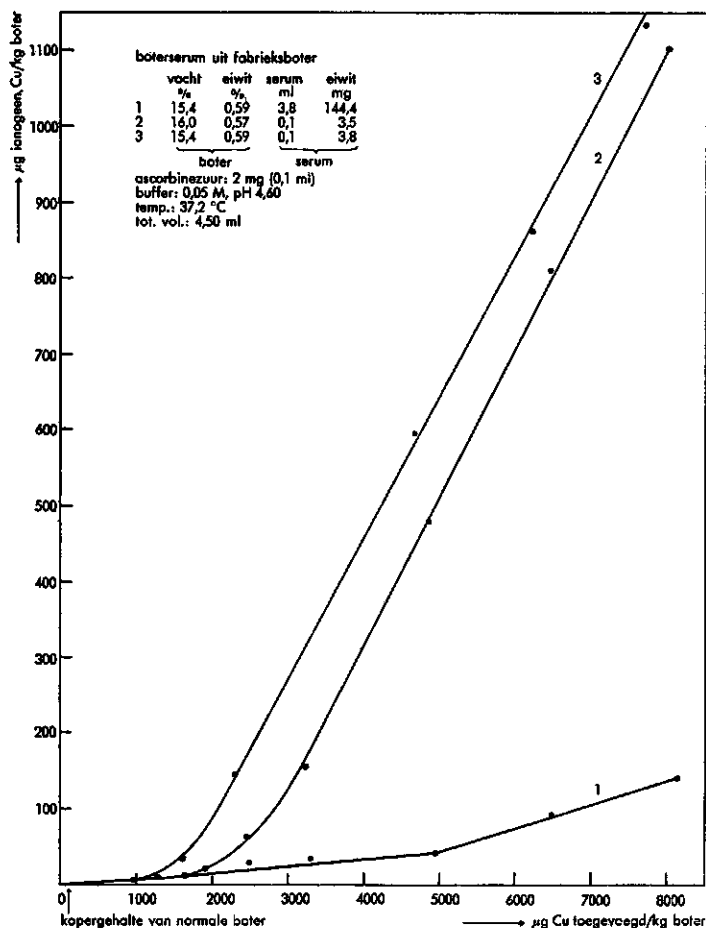


Fig. 53. Ionic copper in butter serum after addition of copper sulphate.

witten volledig weer te geven. De verkregen gegevens zijn min of meer van informatieve aard. In room (en boter) is de verhouding eiwit/koper veel groter.

De vraag kan nu worden gesteld of zich bij pH-verlaging in boter, voor wat betreft de plasmaeiwitten, een evenwicht instelt tussen gebonden en ionogeen koper en of bij dit evenwicht zowel het natuurlijke als het toegevoegde koper zijn betrokken.

Een tweede vraag is, gezien de grotere affiniteit van het membraaneiwit voor koper, of het eventueel door de plasmaeiwitten afgestane koper wordt gebonden aan het eiwit van het oppervlaktelaagje.

## 6. IONOGEEN KOPER IN BOTERSERUM

### 6.1. Manometrisch onderzoek

In fig. 53 zijn de resultaten van een drietal experimenten samengevat die het verband aangeven tussen het toegevoegde en het ionogene koper in boterserum. Daartoe werd van drie partijtjes fabrieksboter van bekende samenstelling (vocht- en eiwitgehalte) resp. 0,1, 0,1 en 3,8 ml serum gepipetteerd in Warburg-vaatjes. Na toevoeging van koper, buffer en ascorbinezuur werd manometrisch de zuurstofabsorptie bepaald. Uit de berekende halfwaardetijden van het ascorbinezuur, waarbij correcties werden aangebracht voor de zuurstofabsorptie van het boterserum zelf, werd vervolgens voor elke hoeveelheid koper afzonderlijk de daarbij behorende hoeveelheid ionogeen koper vastgesteld.

Uit fig. 53 blijkt dat bij een stijgend gehalte aan koper de hoeveelheid ionogeen koper toeneemt. De verhouding gebonden koper/ionogeen koper is o.m. afhankelijk van de eiwit/koper verhouding, hetgeen ook blijkt uit het verloop van curve 1 ten opzichte van de curven 2 en 3. Het kopergehalte van boter ligt echter op een véél lager niveau dan de waarden (horizontale as) die in deze grafiek zijn aangegeven. Ionogeen koper kon voor het gebied van 0-400  $\mu\text{g}$  koper/kg boter niet met zekerheid worden aangetoond. De nauwkeurigheid van deze methode is echter, gelet op de vermenigvuldigingsfactor (1540-1600), niet groot.

### 6.2. Titrimetrisch onderzoek

De titrimetrische methode heeft het voordeel dat met grotere volumina kan worden gewerkt; de vermenigvuldigingsfactor is dientengevolge veel kleiner.

In eerste instantie werd gecontroleerd of ascorbinezuur, toegevoegd aan melk en aan boterserum, kwantitatief kon worden teruggevonden. Dit bleek mogelijk. De titraties werden verricht in trichloorazijnzuurfiltraten van melk en van boterserum, waarbij een correctie werd aangebracht voor geprecipiteerd vet en eiwit. De experimenten, die ten doel hadden de tijd vast te stellen welke benodigd is om de helft van



het ascorbinezuur te oxideren, werden uitgevoerd bij 2°C, om pH-verschuivingen door microbiologische activiteit in het boterserum te voorkomen.

In elk van twee (kopervrije) kolfjes van 300 ml werd 48 ml boterserum gepipetteerd, waarna de inhoud van de kolfjes werd afgekoeld tot 2°C. Vervolgens werd aan beide kolfjes 7 mg ascorbinezuur (175 mg/50 ml dubbel gedestilleerd water, hiervan 2 ml) toegevoegd, waarna in het donker bij 2°C werd geschud. Gelijktijdig werd in een maatkolfje van 50/55 ml 48 ml boterserum gepipetteerd; na toevoeging van 2 ml van de oplossing van ascorbinezuur werd volgens de onder 5.2.2. aangegeven wijze de beginconcentratie van het ascorbinezuur bepaald. Dit geschiedde met het oog op de aanwezigheid van variërende „rest”-hoeveelheden ascorbinezuur in het boterserum (ca. 0,1 à 0,3 mg/kg boter). Daar de halfwaardetijden van de verschillende botersera sterk uiteenliepen, werd telkens in één van de twee monsters na 5 h schudden de overgebleven hoeveelheid ascorbinezuur bepaald, het andere monster werd na 22 h geanalyseerd. Uit de berekende halfwaardetijden kan met behulp van fig. 50 de hoeveelheid ionogeen koper/48 ml boterserum worden vastgesteld.

Op de bovenomschreven wijze werden de sera van 34 monsters fabrieksboter van verschillende herkomst nader geanalyseerd. Tabel 26 geeft een samenvatting van de resultaten en laat zien dat in boter zeer weinig ionogeen koper voorkomt. Het gemiddelde kopergehalte van de 34 monsters boter bedroeg 44 µg/kg, het percentage ionogeen koper was gemiddeld 3,5%, d.i. 1,5 µg/kg boter.

Een gedeelte van elk monster werd in drieën verdeeld, bewaard bij -10°C en organoleptisch beoordeeld na resp. 3, 6 en 9 maanden. Er bleek géén correlatie aanwezig tussen de hoeveelheid ionogeen koper in de boter en de houdbaarheid. Daarentegen bestond deze correlatie wél met betrekking tot het totale kopergehalte van de boter. Ionogeen koper kan dus niet verantwoordelijk worden gesteld voor het ontstaan van koelhuisgebreken bij boter, zoals aanvankelijk werd aangenomen (KOOFS en PETTE, 1956).

## 7. DE INVLOED VAN DE pH OP DE VERDELING VAN HET NATUURLIJKE EN VAN HET TOEGEVOEGDE KOPER IN DE MELK

### 7.1. Inleiding

Zoals in het vorige hoofdstuk is uiteengezet, treedt als gevolg van de daling van de pH, interactie op tussen de cefaline-fractie en het membraaneiwit. De snelheid waarmee deze fractie oxideert is o.m. afhankelijk van de hoeveelheid koper die door het membraaneiwit wordt gebonden. Het aan de plasmaeiwitten gebonden koper oefent hierop vrijwel geen invloed uit.

Het gehalte aan natuurlijk koper van het oppervlaktelaagje bedraagt ca. 4-18 µg/100 g vetbolletjes (gemiddeld 11 µg/100 g), een concentratie die, indien boter wordt bewaard bij -10°C, kennelijk niet voldoende is om in een tijdsbestek van 3-9 maanden

Tabel 26. Ionogeen koper in sera van 34 fabrieksboters.

Fabriek Nr.	H.O.T. <sup>1)</sup> 2°C	Koper		Ionogeen koper	Fabriek Nr.	H.O.T. <sup>1)</sup> 2°C	Koper		Ionogeen koper
		h	µg/kg	µg/kg			totaal	ionogeen	
1	27,1	63	1,3	2,1	18	30,0	36	1,2	3,3
2	27,8	83	1,3	1,6	19	74,5	80	0,6	0,8
3	59,1	48	0,8	1,7	20	47,0	24	0,9	3,8
4	59,7	55	0,7	1,3	21	50,0	10	0,9	9,0
5	42,3	42	1,0	2,4	22	48,0	63	0,9	1,4
6	32,8	83	1,2	1,4	23	30,0	38	1,2	3,2
7	40,0	15	1,0	6,7	24	57,5	44	0,8	1,8
8	46,0	33	0,9	2,7	25	53,0	22	0,8	3,6
9	27,0	38	1,3	3,4	26	30,5	77	1,2	1,6
10	34,5	66	1,2	1,8	27	26,0	18	1,4	7,8
11	30,5	57	1,2	2,1	28	31,0	40	1,2	3,0
12	16,0	16	1,9	11,9	29	19,0	23	1,6	7,0
13	27,5	23	1,3	5,7	30	28,0	59	1,3	2,2
14	27,0	32	1,3	4,1	31	16,5	67	1,8	2,7
15	64,0	44	0,7	1,6	32	31,5	34	1,2	3,5
16	30,5	16	1,2	7,5	33	39,0	60	1,1	1,8
17	120,0	20	0,3	1,5	34	17,5	70	1,7	2,4

<sup>1)</sup> Half-Oxidation-Time. De tijd benodigd om de helft van de hoeveelheid ascorbinezuur te oxideren.  
Gemiddeld kopergehalte: 44 µg/kg boter.

Ionogeen koper: 3,5% van de totale hoeveelheid koper.

Table 26. *Ionic copper in butter serums of 34 factory-made butters.*

aanleiding te geven tot het ontstaan van koelhuisgebreken. Van het toegevoegde koper, waarvan zonder twijfel de schadelijkheid is vastgesteld, wordt bij pH 6,8 slechts 1 à 2 % aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes gebonden. Doseringen van 50–100  $\mu\text{g}$  koper/kg melk, tengevolge waarvan in boter na 3–9 maanden koelhuisgebreken ontstaan, doen bij deze pH het gehalte aan koper van het oppervlaktelaagje slechts in geringe mate toenemen (2,5–5,0  $\mu\text{g}$  koper/100 g vetbolletjes). De beslissende invloed van de pH en van koper op de houdbaarheid van boter doet veronderstellen dat als gevolg van de pH-daling een wijziging optreedt in de koperverdeling, in die zin, dat migratie plaats heeft van het aan de plasmaeiwitten gebonden koper naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Deze veronderstelling wordt gesteund door het feit dat de plasmaeiwitten de neiging hebben bij pH 4,6 een deel van het door hen gebonden koper af te staan (fig. 52B) en dat in boter vrijwel geen ionogeen koper aanwezig is. Migratie van het natuurlijke koper treedt echter zeer waarschijnlijk niet op, daar boter bereid uit nieuwe melk (kopergehalte  $\leq 215 \mu\text{g/kg}$ ) geen geringere houdbaarheid heeft dan boter bereid uit normale melk (kopergehalte  $\leq 40 \mu\text{g/kg}$ ). De verschuivingen in koperbinding zouden zich dan beperken tot het toegevoegde koper.

## 7.2. Het gedrag van het natuurlijke koper in de melk bij pH-veranderingen

### 7.2.1. Aanzuren en neutraliseren van melk: pH 6,6 $\rightarrow$ 1, 8 $\rightarrow$ 6,6

Indien melk wordt aangezuurd tot zeer lage pH-waarden, gaat een zeer groot gedeelte van het koper in de melk over in ionogene vorm. Door vervolgens de melk te neutraliseren treedt re-adsorptie van het ionogene koper op. De vraag doet zich nu voor, of de verdeling van het koper over de vet- en waterfase van de melk na de pH-behandeling dezelfde is als ervóór. Dit werd voor een zestal monsters melk van nieuwmelkse koeien nader onderzocht.

De melk werd gewonnen onder uitsluiting van koperinfectie en verdeeld in twee porties. Eén portie werd met 4 N zwavelzuur (p.a.) voorzichtig aangezuurd tot een pH van ca. 1,8 en daarna gedurende 15 min op deze pH-waarde gehouden. Vervolgens werd met 4 N natriumhydroxide (p.a.) langzaam geneutraliseerd tot de oorspronkelijke pH was bereikt. Zowel het zuur als de loog werd kopervrij gedoseerd. Aan de andere portie melk werden dezelfde hoeveelheden zuur en loog toegevoegd, doch nu in één keer als mengsel. De beide porties werden, nadat van elk een monster was genomen, gedurende ca. 3 min gecentrifugeerd (3 000 rpm), waarna de roomlaag werd afgepipetteerd en verdund met een gedeelte van de bijbehorende ondermelk. De verdeling van het koper over de vet- en waterfase werd bepaald volgens Mulder's oproommethode. Tabel 27 geeft een samenvatting van de experimenten en laat zien dat als gevolg van deze pH-behandeling van de melk, de hoeveelheid koper in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes aanzienlijk is gestegen. De verschillen in eiwitgehalte van de monsters room vóór en na de pH-behandeling zijn, met inachtneming van de

Tabel 27. De invloed van een pH-behandeling van de melk op de verdeling van het natuurlijke koper over de vet- en waterfase van de melk (pH 6,6 → 1,8 → 6,6).

Aantal dagen na het afkalven	Kopergehalte				Vetgehalte				Eiwitgehalte v. d. room				Koper in het opp. laagje in % van het totaal				$\mu\text{g}$ koper/100 g vetbolletjes			
	A		B		A		B		A		B		A		B		A		B	
	melk	room	melk	room	melk	room	melk	room	melk	room	melk	room	A	B	A	B	A	A	B	B
8	$\mu\text{g/kg}$ 84	$\mu\text{g/kg}$ 81	$\mu\text{g/kg}$ 85	$\mu\text{g/kg}$ 266	% 3,35	% 24,10	% 3,35	% 17,50	% 2,58	% 2,94	% 2,46	% 3,37	% 2,7	% 52,1	% 18,6	% 168,6	$\mu\text{g}$ 7,0	$\mu\text{g}$ 132,1		
4	212	206	213	611	6,15	28,00	6,15	31,50	2,48	2,46	3,18	3,37	5,5	48,7	5,5	168,6				
4	89	94	89	182	3,70	16,40	3,70	17,40	3,18	3,37	3,18	3,37	5,3	30,9	5,3	74,3				
4	116	120	116	195	4,37	14,60	4,37	14,50	3,30	3,28	3,30	3,28	5,8	32,5	5,8	86,2				
4	125	119	125	246	4,29	20,90	4,29	19,60	2,60	2,80	2,60	2,80	3,1	30,2	3,1	88,1				
5	72	74	72	177	4,60	17,90	4,60	19,10	2,99	3,06	2,99	3,06	5,6	48,8	5,6	76,3				

A = vóór de pH-behandeling.

B = na de pH-behandeling.

Table 27. The influence of pH treatment of milk on the partition of natural copper between the fat and water phases of milk (pH 6,6 → 1,8 → 6,6).

verschillen in vetgehalte, gering. Het pH-effect kan dus niet worden toegeschreven aan precipitatie van plasmaeiwitten op het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Blijkbaar wordt het als gevolg van de pH-verlaging gevormde, ionogene koper bij langzaam opvoeren van de pH bij voorkeur geadsorbeerd aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes (fig. 52B). Deze verschuiving in binding van het koper geeft een verklaring voor het onder 1. genoemde verschijnsel, dat het van nature in melk aanwezige koper wel actief is ten opzichte van het ontstaan van koelhuisgebreken in boter, indien de melk tot een lage pH-waarde wordt aangezuurd en vervolgens wordt geneutraliseerd.

### 7.2.2. Aanzuren en neutraliseren van melk: pH 6,6 → 4,6 → 6,6

Op dezelfde wijze als is beschreven onder 7.2.1. werd de invloed nagegaan van een meer gematigde pH-behandeling van de melk: aanzuren tot pH 4,6 en vervolgens neutraliseren tot pH 6,6. De bedoeling was gegevens te verkrijgen omtrent een eventuele wijziging in de verdeling van het natuurlijke koper in de melk, c.q. de room, tijdens het normale bacteriologische zuringsproces (pH 6,6 → 4,6).

Zoals uit de voorgaande experimenten is gebleken, komt in boterserum (pH 4,6) vrijwel geen ionogeen koper voor. Indien nu de plasmaeiwitten bij pH 4,6 koper afstaan, zal dit natuurlijke ionogene koper worden gebonden aan het membraaneiwit en bij de daaropvolgende neutralisatie blijkbaar niet meer worden afgestaan.

Fig. 54. De ladingstoestand van het oppervlaktelaagje en van de plasmaeiwitten in het pH-gebied 3,0-5,4.

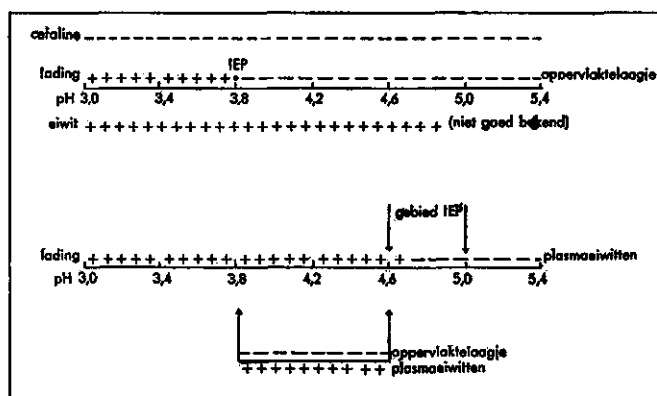


Fig. 54. The charge situation of the fat globule membrane and of the plasma proteins in the pH area 3,0-5,4.

Uit de resultaten van twee experimenten (tabel 28) komt echter naar voren dat als gevolg van deze pH-behandeling van de melk, er geen of nauwelijks sprake is van een verschuiving in binding van het natuurlijke koper. Het is dus niet waarschijnlijk

Tabel 28. De invloed van een pH-behandeling van de melk op de verdeling van het natuurlijke koper over de vet- en waterfase van de melk (pH 6,6 → 4,6 → 6,6).

Aantal dagen na het afkalven	Kopergesalte				Vetgehalte				Eiwitgehalte v. d. room		Koper in het opp. laagje in % van het totaal				µg koper/100 g vetbolletjes	
	A		B		A		B		A	B	A	B	A	B	A	B
	melk	room	melk	room	melk	room	melk	room								
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	µg	µg
5	70	73	70	75	4,92	18,10	4,92	18,30	3,28	3,22	6,4	7,4	9,1	10,6		
6	71	79	71	79	5,12	25,10	5,12	21,00	2,88	3,08	7,9	8,6	10,9	11,9		

A = vóór de pH-behandeling.

B = ná de pH-behandeling.

Table 28. The influence of pH treatment of milk on the partition of natural copper between the fat and water phases of milk (pH 6,6 → 4,6 → 6,6).

dat natuurlijk koper bij pH 4,6 naar het membraan van de vetbolletjes migreert. De afgifte van het aan de plasmaeiwitten gebonden natuurlijke koper vindt dus slechts plaats bij pH-waarden beneden 4,6.

In fig. 54 is zowel voor het oppervlaktelaagje als voor de plasmaeiwitten de ladings-toestand in het pH-gebied 3,0–5,4 schematisch weergegeven. Wat betreft het oppervlaktelaagje kan worden opgemerkt dat het IEP bij pH 3,8 ligt, voor waarden  $> 3,8$  is het membraan negatief geladen. Het IEP van de plasmaeiwitten (caseïne,  $\beta$ -lactoglobuline en  $\alpha$ -lactalbumine) ligt in het pH-gebied 4,6–5,0. Tussen pH 3,8 en 4,6 heeft het membraan een negatieve lading; de plasmaeiwitten zijn dan juist positief geladen.

Het is niet onwaarschijnlijk dat bij neutralisatie van tot pH 1,8 aangezuurde melk, het oppervlaktelaagje in dit nauwe pH-gebied méér ionogeen koper adsorbeert dan de plasmaeiwitten. Ongetwijfeld treedt echter ook bij waarden beneden pH 4,6 adsorptie op van koperionen aan de plasmaeiwitten ( $p_K$ -waarden COOH groepen aminozuren ca. 3,0–5,0). Aan de vraag in hoeverre denaturatie van de eiwitten, als gevolg van het aanzuren en neutraliseren van de melk, een factor is die de uiteindelijke verdeling van het koper mede bepaalt, werd in dit verband geen nadere aandacht geschonken.

### *7.2.3. Het natuurlijke koper in de melk bij pH 4,6*

Een direct onderzoek naar de verdeling van het natuurlijke koper bij pH 4,6 stuit op het bezwaar dat de tot deze pH-waarde aangezuurde melk zich bij het centrifugeren in glazen buizen (3 000 rpm) niet laat scheiden in room en in ondermelk. Deze scheiding kan wél worden bewerkstelligd in een sneldraaiende fabriekscentrifuge, doch in dat geval blijven de plasmaeiwitten achter in het centrifugeslib. Dit was dan ook de reden dat langs indirecte weg werd getracht gegevens te verkrijgen over de verdeling van het natuurlijke koper in melk bij pH 4,6.

Uit de voorgaande experimenten werd geconcludeerd dat bij pH 4,6 geen afgifte plaats heeft van het aan de plasmaeiwitten gebonden natuurlijke koper (tabel 28). Dit verschijnsel treedt slechts op indien de melk wordt gezuurd tot lagere pH-waarden (tabel 27). De resultaten van deze experimenten vinden hun bevestiging in proeven van KING (1958). Genoemde onderzoeker injecteerde koeien met radioactief koper en stelde vast dat in ondermelk en in melk uit gewassen room (vetbolletjes in water), het natuurlijke (radioactieve) koper bij pH 6,8 en 4,6 niet dialyseerbaar was. MENDER (1961) kon geen aanwijzing vinden dat koper door het zuur worden van de melk in ionvorm overging.

Bij de bereiding van boter uit gezuurde room van resp. normale melk (laag kopergehalte) en van nieuwe melk (hoog kopergehalte) zal in beide gevallen de concentratie aan natuurlijk koper in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes dezelfde zijn. Dit verklaart dat er, voor wat betreft het kopergehalte van de boter, geen verschil in houdbaarheid hoeft te bestaan tussen beide soorten boter.

### 7.3. Het gedrag van het toegevoegde koper bij pH 4,6. Experimenten met radioactief koper

De experimenten betreffende de verdeling van het toegevoegde koper over de vet- en waterfase van gezuurde room (pH 4,6) werden gelijktijdig uitgevoerd met de proeven vermeld onder 4.2.

In het eerste experiment werd aan 30 kg melk (37°C) ca. 225  $\mu\text{g}$  radioactief koper/kg melk toegevoegd. De door centrifugeren van de melk verkregen room werd in twee porties verdeeld. Eén portie werd vijfmaal met telkens een vijfvoudige hoeveelheid water gewassen, de andere portie room werd met 1 N zwavelzuur aangezuurd tot pH 4,6 en gedurende 2 h bewaard. Vervolgens werd de gezuurde room op dezelfde wijze gewassen als de niet gezuurde room, doch nu met aangezuurd water van pH 4,6.

In een tweede experiment (één dag later uitgevoerd) werd aan room, verkregen door 20 kg melk (37°C) te centrifugeren, ca. 125  $\mu\text{g}$  radioactief koper/kg room toegevoegd. De room werd in twee porties verdeeld; één portie werd gewassen bij pH 6,6, de andere na aanzuren tot pH 4,6 met aangezuurd water. De radioactiviteit van de monsters melk, room en gewassen room werd bepaald op de onder 4.2. beschreven wijze.

Tabel 29A geeft een samenvatting van de voor dit onderzoek belangrijke gegevens en laat zien dat als gevolg van de pH-verlaging migratie optreedt van het aan de plasmaeiwitten gebonden toegevoegde koper naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. De verschillen komen duidelijker tot uiting indien de kopergehalten van de porties gewassen room worden berekend op het vetgehalte van de oorspronkelijke porties room (tabel 29B). Uit de laatste kolom van deze tabel blijkt dat ca. 30–40% van het toegevoegde koper migreert naar het membraan van de vetbolletjes.

Als bezwaar tegen deze werkwijze zou kunnen worden aangevoerd dat er, als gevolg van de pH-verlaging, eiwit precipiteert op het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes, dat mogelijk bij de daarop volgende wasprocedure niet volledig wordt verwijderd. Het vet- en eiwitgehalte van de gewassen room (expt. nr. 1, tabel 29A) bedroeg resp. 33,58 en 0,27%. De gewassen room van pH 4,6 bevatte bij een vetgehalte van 26,78%, 0,21% eiwit. De „zoete” gewassen room zou bij een vetgehalte van 26,78% ca.  $26,78/33,58 \times 0,27 = 0,22\%$  eiwit bevatten. Voor de room van expt. nr. 2 zou deze waarde  $17,89/33,91 \times 0,28^5 = 0,15\%$  bedragen. Precipitatie van caseïne kan dus niet van belang zijn.

Een mogelijke complicatie in de gevolgde werkwijze zou kunnen zijn dat, als gevolg van de aanzienlijke verdunning van de room, een „uitwaseffect” optreedt, waardoor een deel van het aan de plasmaeiwitten gebonden koper migreert naar de vetbolletjes. Dit effect trad bij pH 6,5 niet op, daar zowel volgens de oproom- als volgens de wasmethode ca. 1–2% van het toegevoegde koper werd gebonden aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Om die reden werd het aannemelijk geacht hetzelfde te veronderstellen voor gezuurde gewassen room.

De resultaten van deze experimenten leiden tot dezelfde conclusie als waartoe



Tabel 29A. De invloed van een pH-behandeling van de room (pH 6,5 → 4,6) op het gehalte aan toegevoegd radioactief koper van gewassen room.

Expt. Nr.	Room		Gewassen room						Factor	Cu <sup>64</sup> room		Cu <sup>64</sup> gewassen room		Cu <sup>64</sup> /g eiwit (opp. laagje)	
	vet- gehalte	impulsen/ min	pH 6,5			pH 4,6				pH 6,5	pH 4,6	pH 6,5	pH 4,6	pH 6,5	pH 4,6
			vet- gehalte	eiwit- gehalte	impulsen/ min	vet- gehalte	eiwit- gehalte	impulsen/ min							
%	kg	%	%	%	kg	%	%	%	i.p.m./μg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/g	μg/g	
1	35,61	0,870 × 10 <sup>8</sup>	33,58	0,27	18,376 × 10 <sup>8</sup>	26,78	0,21	31,8 × 10 <sup>8</sup>	0,527 × 10 <sup>8</sup>	165	35	60	13	29	
2	28,07	1,851 × 10 <sup>7</sup>	33,91	0,28 <sup>s</sup>	4,263 × 10 <sup>8</sup>	17,89	0,12 <sup>s</sup>	6,539 × 10 <sup>8</sup>	0,144 × 10 <sup>8</sup>	128	30	45	10	37	

Table 29A. The influence of pH treatment of cream (pH 6,5 → 4,6) on the added radioactive copper content of washed cream.

Tabel 29B. De invloed van de pH (pH 6,5 → 4,6) op de migratie van toegevoegd radioactief koper van de plasmaciwitten naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes.

Expt. nr. (Tabel 29A)	Room		Gewassen room		Koper in gewassen room, berekend op het vetgehalte v.d. oorspr. room		Koper in het „plasma” van gewassen room		Migratie van plasmakoper (Cu <sup>64</sup> ) naar het oppervlakte laagje	
	vetgehalte	kopergehalte	pH 6,5	pH 4,6	vetgehalte	kopergehalte	pH 6,5	pH 4,6	pH 6,5	pH 4,6
	%	μg/kg	%	%	μg/kg	%	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg
1	35,61	165	33,58	30	26,78	60	37	80	128	85
2	28,07	128	33,91	30	17,89	45	25	70	103	58
										%
										%
										%

Table 29B. The influence of pH (pH 6,5 → 4,6) on the migration of added radioactive copper from the plasma proteins to the fat globule membrane.

KING (1958), zij het op andere wijze, was gekomen. Blijkbaar bestaat er voor wat betreft de plasmaeiwitten, een verschil in chemische binding tussen het natuurlijke en het toegevoegde koper: het natuurlijke koper is in het pH-traject 6,5–4,6 niet dialyseerbaar, d.w.z. wordt niet (gedeeltelijk) van de plasmaeiwitten verwijderd, het toegevoegde koper echter wel.

KING (1958) stelde verder vast dat zowel het natuurlijke als het toegevoegde koper van het oppervlaktelaagje niet dialyseerbaar zijn bij pH 4,6. Hij concludeerde hieruit dat de chemische binding van het natuurlijke en van het toegevoegde koper aan het membraaneiwt dezelfde zou zijn. Deze conclusie is echter niet zonder meer gerechtvaardigd. Men kan zich voorstellen dat het natieve koper van het membraaneiwt zich bevindt op bepaalde discrete plaatsen in het eiwitmolecule (vgl. MENDER, 1961) en daar invloed uitoefent op de oxidatie van de fosfatiden. Van het aan de melk toegevoegde koper zal bij pH-verlaging een gedeelte migreren naar de vetbolletjes en zich eveneens hechten aan het membraaneiwt. De wijze waarop dit toegevoegde koper wordt gebonden hoeft niet identiek te zijn aan die van het natuurlijke koper. Wellicht zijn er ten aanzien van de beschikbare plaatsen van waaruit de oxidatie van het fosfatide-molecule bij pH 4,6 op gang kan worden gebracht, meerdere mogelijkheden.

In dit verband dient niet uit het oog te worden verloren dat, als gevolg van de pH-verlaging, de interactie tussen cefaline en het membraaneiwt toeneemt, waardoor ook koper dat op een andere wijze is gebonden dan het natieve koper een gunstige plaats zou kunnen bezetten. Zolang ons echter geen duidelijk beeld voor ogen staat van de opbouw van de lipoproteïnen en van de wijze waarop de pH invloed uitoefent op de structurele verbanden, kan hierover weinig met zekerheid worden gezegd.

De invloed van een lage pH-waarde (4,6) op het ontstaan van koelhuisgebreken in boter manifesteert zich blijkbaar op tweeërlei wijze:

1. de interactie tussen fosfatiden (cefaline) en membraaneiwt neemt toe, waardoor de gevoeligheid voor oxidatie van het lipoproteïnecomplex sterk wordt verhoogd.
2. een gedeelte van het toegevoegde koper migreert van de plasmaeiwitten naar het membraaneiwt, waardoor de totale hoeveelheid koper in het oppervlaktelaagje, afhankelijk van de mate waarin de melk is besmet met koper, aanzienlijk toeneemt.

Het voorkómen van koelhuisgebreken in boter zal dan ook, gezien de wijze waarop het toegevoegde koper zich gedraagt, in eerste instantie dienen te worden gezocht in het elimineren van elke bron van koperbesmetting bij de winning en verwerking van de melk.

## 8. HET KOPER IN DE BOTER

De vraag kan worden gesteld hoe hoog het gehalte van boter is aan natuurlijk koper. Uit een onderzoek naar het kopergehalte van ruim 140 monsters boter van verschillende herkomst (zie Hfdst. VI. 3.1.), wordt de indruk verkregen dat een gehalte

van  $\leq 20 \mu\text{g}$  koper/kg boter ( $\leq 0,02$  ppm) als een normale waarde kan worden beschouwd. Hierbij dient echter te worden opgemerkt dat variaties in het natuurlijk kopergehalte van boter, afgezien van variaties in het kopergehalte van melk, mogelijk zijn. Uit hoofdstuk VI. 3.2., waar de invloed van het vetgehalte van de room op het kopergehalte van de uit de room bereide boter nader wordt besproken, zal blijken dat op het kopergehalte van boter o.m. door technische maatregelen invloed kan worden uitgeoefend.

Uitgaande van een waarde van  $20 \mu\text{g}$  koper/kg boter kan globaal worden berekend hoe het natuurlijke koper in boter is verdeeld over het membraaneiwit en de plasma-eiwitten. Daartoe is in onderstaande berekening uitgegaan van „standaardmelk”: vet-, eiwit- en kopergehalte resp. 3,80%, 3,20% en  $25 \mu\text{g/kg}$ . Aangenomen werd dat 17% van de totale hoeveelheid koper is gebonden aan de vetbolletjes en dat 100 g vetbolletjes 1 g membraaneiwit bevatten. MULDER en MENDER (1958) stellen deze hoeveelheid op 0,1–3 g eiwit/100 g vetbolletjes, met als gemiddelde een waarde van ca. 0,8 g.

Tabel 30. Het eiwitgehalte en de hoeveelheid eiwit/100 g vetbolletjes van gewassen room.

$$\left( \text{Factor } \frac{100}{12,45} = 8,03 \right)$$

Expt. Nr.	Aantal malen wassen van de room	Vetgehalte	Eiwitgehalte	Eiwit/100 g vetbolletjes
		%	%	g
1	9	32,4	0,31	0,96
2	9	17,6	0,14	0,80
3	9	48,0	0,37	0,77
4	9	18,2	0,16	0,88
5	9	51,8	0,48	0,93
6	8	13,3	0,12	0,90
7	8	49,3	0,41	0,83
8	8	17,6	0,17	0,97
9	8	43,3	0,41	0,95
10	8	17,3	0,15	0,87
11	8	43,0	0,37	0,86
12	5	33,6	0,35	1,04
13	5	26,8	0,27	1,01
14	5	33,9	0,36	1,06
15	5	17,9	0,17	0,95

Table 30. Protein content and amount of protein/100 g fat globules of washed cream.

In tabel 30 zijn de resultaten vermeld van een aantal experimenten waarbij het eiwitgehalte van gewassen room werd bepaald. Als „Kjeldahl-factor” werd aangehouden  $100/12,45 = 8,03$ . Geen correcties werden aangebracht voor N in fosfatiden. Uit deze tabel blijkt dat in gewassen room de hoeveelheid eiwit/100 g vetbolletjes

afhankelijk is van het aantal malen wassen van de room en voor de resp. 9, 8 en 5 maal gewassen room 0,87, 0,90 en 1,02 g bedraagt, bij gemiddelde vetgehalten van resp. 33,6, 30,6 en 28,1 %.

Met behulp van de gegevens voor de „standaardmelk” kan worden berekend dat 1 g membraaneiwit 11  $\mu\text{g}$  koper bevat, het kopergehalte van de plasmaeiwitten bedraagt 0,7  $\mu\text{g/g}$ . Tijdens en na het bacteriologische zuringsproces vindt geen migratie plaats van het natuurlijke koper, hetgeen zou betekenen dat 1 kg boter, bij een kopergehalte van 20  $\mu\text{g/kg}$  en een eiwitgehalte van 0,6 %, ongeveer 1,5 g membraaneiwit en 4,5 g plasmaeiwitten bevat. Variaties in het gehalte aan natuurlijk koper van de boter worden dus voornamelijk veroorzaakt door verschillen in gehalte aan membraaneiwit (zie Hfdst. VI. 3.2.).

Toegevoegd koper verdeelt zich bij pH 6,6 naar rato over de eiwitten en bij verlaging van de pH tot 4,6 migreert ca. 40 % van het aan de plasmaeiwitten gebonden toegevoegde koper naar de vetbolletjes. Een toevoeging van 100  $\mu\text{g}$  koper/kg melk heeft tot gevolg dat in de uit deze melk bereide en bij  $-10^{\circ}\text{C}$  bewaarde boter, het gebrek tranig meestal optreedt tussen de 3e en de 6e maand.

Gebaseerd op een toevoeging van 100  $\mu\text{g}$  koper/kg melk kan de volgende berekening worden opgezet:

- a. Melk pH 6,6. 1 % van het toegevoegde koper wordt geadsorbeerd aan de vetbolletjes, d.i.  $1 \mu\text{g}/380 \text{ mg}$  membraaneiwit of 2,6  $\mu\text{g/g}$ . De plasmaeiwitten adsorberen 99  $\mu\text{g}/32 \text{ g}$ , d.i. 3,1  $\mu\text{g/g}$ . Kopergehalte membraaneiwit:  $11^n + 2,6^t$ ; kopergehalte plasmaeiwitten:  $0,7^n + 3,1^t$  ( $n = \mu\text{g}$  natuurlijk,  $t = \mu\text{g}$  toegevoegd koper);
- b. Room pH 6,6. Room met een vetgehalte van 20 % bevat ca. 2 g membraaneiwit en  $800/962 \times 32 \text{ g} = 26,6 \text{ g}$  plasmaeiwitten. Kopergehalte:  $2 (11^n + 2,6^t) + 26,6 (0,7^n + 3,1^t) = 128 \mu\text{g/kg}$ ;
- c. Room pH 4,6. Van het aan de plasmaeiwitten gebonden toegevoegde koper migreert 40 % naar de vetbolletjes, d.i.  $40/100 \times 82,5 = 33 \mu\text{g}$ . Kopergehalte membraaneiwit/g:  $11^n + 2,6^t + 16,5^t = 30,1 \mu\text{g}$ ; kopergehalte plasmaeiwitten/g:  $0,7^n + 1,9^t = 2,6 \mu\text{g}$ . Het kopergehalte van het membraaneiwit is dus meer dan tweemaal zo hoog geworden, waardoor de gevoeligheid voor het optreden van oxidatiegebreken sterk zal zijn toegenomen;
- d. Boter pH 4,6. Kopergehalte:  $1,5 \times 30,1 + 4,5 \times 2,6 = 57 \mu\text{g/kg}$ . Voor 2 g membraaneiwit en 4 g plasmaeiwitten bedraagt de waarde 71  $\mu\text{g/kg}$ , hetgeen illustreert dat het kopergehalte van boter voornamelijk wordt bepaald door de hoeveelheid ingesloten membraaneiwit.

Tenslotte moet nog worden opgemerkt dat in dit voorbeeld geen rekening is gehouden met een eventuele gedeeltelijke verwijdering van membraanmateriaal van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes tijdens de technische bewerkingen (zie Hfdst. VI. 2.).

## PRAKTISCHE MAATREGELEN TER BESTRIJDING VAN KOELHUISGEBREKEN VAN BOTER

### 1. INLEIDING

Nu het gedrag van het natuurlijke en het toegevoegde koper duidelijk is, kan het ontstaan van koelhuisgebreken van boter op een weinig ingrijpende manier worden voorkomen. Zonder meer kan worden gesteld dat het elimineren van elke bron van koperbesmetting, in alle stadia van de winning en de verwerking van melk, zal leiden tot een aanzienlijke verbetering van de houdbaarheid van boter. Dit impliceert de vervanging van tot koperbesmetting aanleiding gevende apparatuur door die van roestvrij staal, zowel op de boerderij als in de fabriek. Hierop is van verschillende zijde (MULDER c.s., 1949; MENDER en MULDER, 1957; RAADSVELD, 1957, 1959; BLAAUW en RAADSVELD, 1961) reeds meermalen gewezen. Gezien de onmiddellijke financiële consequenties blijkt deze weg somtijds niet de meest gewaardeerde.

De oxidatie van de fosfatiden (cefaline) in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes komt bij koperbesmetting van melk, room of boter snel op gang. Het ontstaan van koelhuisgebreken zou kunnen worden voorkomen, c.q. worden vertraagd door op een of andere wijze de oxidatie van het oppervlaktelaagje te belemmeren. Dit zou in principe kunnen worden verwezenlijkt door:

- a. gehele of gedeeltelijke verwijdering van het lipoproteïnecomplex;
- b. het voorkomen of verminderen van de migratie van het toegevoegde koper;
- c. het doen ontstaan of het toevoegen van antioxidanten.

Mogelijkheden die op het technische bereidingsproces een zódanige invloed uitoefenen dat niet meer kan worden gesproken van een normaal produkt, zijn in dit onderzoek buiten beschouwing gelaten.

Het doel van de in dit hoofdstuk beschreven onderzoeken was na te gaan op welke wijze een bijdrage zou kunnen worden geleverd tot het verbeteren van de kwaliteit van koelhuisboter.

### 2. DE INVLOED VAN BEWERKINGEN VAN DE MELK OF ROOM OP DE VERDELING VAN DE FOSFATIDEN TUSSEN DE VET- EN WATERFASE VAN DE ROOM

MULDER (1957) wees op het feit dat het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes door de bewerkingen van melk in het zuivelbedrijf irreversibele veranderingen ondergaat. Er wordt een gedeelte van het oppervlaktelaagje afgestoten, terwijl ook adsorptie van plasmabestanddelen optreedt. RADEMA (1956) constateerde dat door verhitten van

room een gedeelte van de fosfatiden werd verwijderd uit het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes.

KOOPS en TARASSUK (1959) bestudeerden de invloed van warmtebehandelingen, centrifugeren en homogeniseren op de verdeling van de fosfatiden tussen de vet- en waterfase van de room. Hierbij werd gebruik gemaakt van de methode beschreven door MULDER (1957) om de verdeling van de fosfatiden tussen beide fasen, gebaseerd op het vet- en fosfatidegehalte van melk en room, te bepalen. De resultaten van dit onderzoek kunnen als volgt worden samengevat:

1. door centrifugeren van melk wordt ca. 20% van de aan de vetbolletjes gebonden fosfatiden verwijderd. Zowel de temperatuur van de melk tijdens het centrifugeren als het vetgehalte van de room oefenen hierop een geringe invloed uit.
2. het verhitten van melk of room (80–90°C) heeft tot gevolg dat ca. 20% van de aan de vetbolletjes gebonden fosfatiden migreert naar het melkplasma.
3. homogenisatie van melk, waarbij drukken tot 200 kg/cm<sup>2</sup> werden toegepast, deed de hoeveelheid fosfatiden in het oppervlaktelaagje met ca. 15% dalen.

Uit deze resultaten kan de conclusie worden getrokken dat op het percentage fosfatiden, gebonden aan de vetbolletjes, slechts in betrekkelijk geringe mate invloed kan worden uitgeoefend. Het grootste gedeelte van de aan de vetbolletjes gebonden fosfatiden kan dus niet worden verwijderd door middel van bewerkingen in het zuivelbedrijf. Tot deze conclusie kwamen ook GREENBANK en PALLANSCH (1961).

Het lipoproteïnecomplex kan wel worden verwijderd door room op normale wijze te karnen en vervolgens de verkregen boter uit te smelten, het botervet te emulgeren in ondermelk en opnieuw te karnen. Een dergelijke procedure is echter omslachtig en kostbaar en levert een afwijkend produkt. Bovendien moet homogenisatie worden toegepast om het botervet te emulgeren in ondermelk, hetgeen aanleiding kan geven tot (aanzienlijke) vetverliezen in de karnemelk. FISHER (1959) toonde aan dat onder zijn proefomstandigheden het vetgehalte van de karnemelk reeds bij een homogenisatiedruk van 10 kg/cm<sup>2</sup> ca. 1,8% bedroeg.

### 3. HET VOORKOMEN OF VERMINDEREN VAN MIGRATIE VAN HET TOEGEVOEGDE KOPER

#### 3.1. Het elimineren van koperbesmetting

In de inleiding van dit hoofdstuk werd opgemerkt dat indien men besmetting met koper weet uit te schakelen, het vraagstuk van de slecht houdbare koelhuisboter zal zijn teruggebracht tot het incidenteel voorkomen van een minder goed houdbare boter.

Hoe gevaarlijk besmetting met koper is, illustreert fig. 55A. In deze figuur zijn de kopergehalten van 82 van verschillende bedrijven afkomstige zomerboter uitgezet tegen de keuringsresultaten na resp. 3, 6 en 9 maanden bewaring bij –10°C. Na 3 maanden bewaring blijkt reeds dat boter met een laag kopergehalte zich in het

Fig. 55A. Het verband tussen de kopergehalten van 82 partijtjes boter van verschillende herkomst en de organoleptische keuringsresultaten na 3, 6 en 9 maanden bewaring bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . N = normaal; V = vettig; T = tranig.

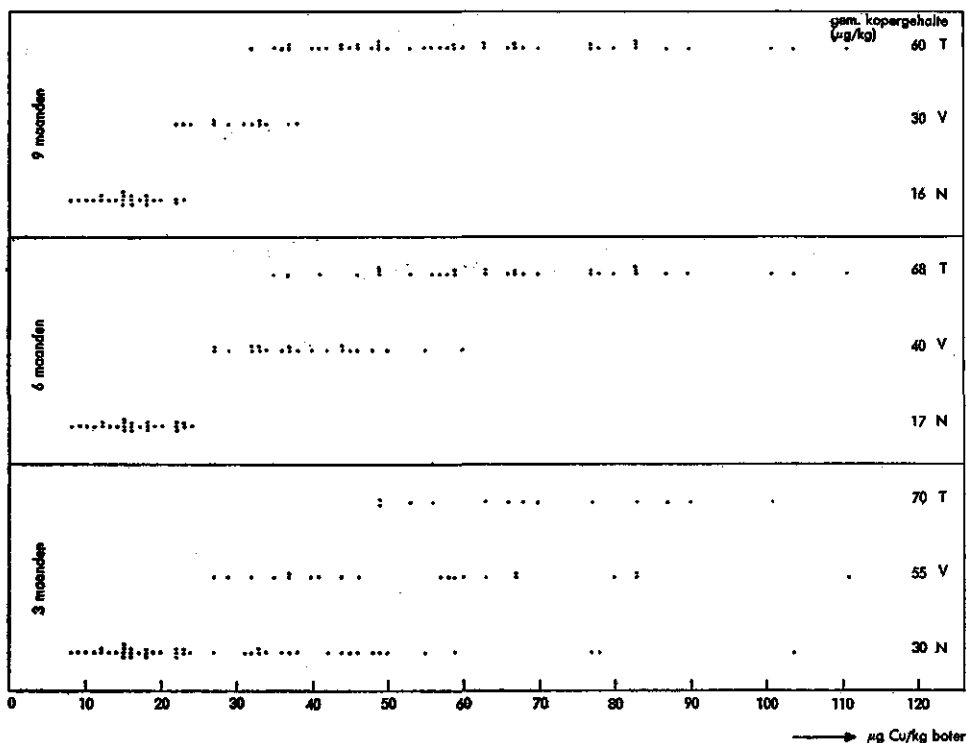


Fig. 55A. Relation between the copper contents of 82 butters of different origin and the organoleptic scores after 3, 6 and 9 months storage at  $-10^{\circ}\text{C}$ . N = normal; V = fatty; T = trainy.

koelhuis beter houdt dan boter met een hoog gehalte aan koper. Het verschil in houdbaarheid komt, naarmate de tijd van bewaring wordt verlengd, steeds duidelijker tot uiting. Na 9 maanden bewaring was het beeld als volgt: het gemiddeld kopergehalte van de goed houdbare partijtjes boter bedroeg ca.  $16 \mu\text{g/kg}$  ( $8-23 \mu\text{g}$ ), overeenkomend met het natuurlijk gehalte aan koper. Lichte smaakgebreken (vettig) traden reeds op indien het kopergehalte tussen  $22$  en  $38 \mu\text{g/kg}$  lag. Waarden boven ca.  $35 \mu\text{g/kg}$  gaven (vrijwel) zonder uitzondering aanleiding tot het optreden van tranigheid. Met nadruk moet er echter op worden gewezen, dat deze figuur géén beeld geeft van de gemiddelde kwaliteit van de Nederlandse koelhuisboter. Een groot gedeelte van de monsters was nl. afkomstig van bedrijven waar koperbesmetting niet was uitgesloten, een ander (klein) gedeelte was afkomstig van de NIZO-proeffabriek waar opzettelijk koper aan de melk was toegevoegd.

Een enkele jaren later ingesteld onderzoek naar de houdbaarheid van 59 partijtjes zomerboter, geproduceerd door een zestal bedrijven gedurende de maanden juli en augustus, wees uit dat deze grenzen voor 9 maanden-oude koelhuisboter niet irreëel

zijn. De gemiddelde kopergehalten van de partijtjes normale, vette en tranige koelhuishoter bedroegen resp. 16, 24 en 34  $\mu\text{g/kg}$  (fig. 55B).

Fig. 55B. Het verband tussen de kopergehalten van 59 partijtjes boter, afkomstig van zes verschillende fabrieken en de organoleptische keuringsresultaten na 6 en 9 maanden bewaring bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . N = normaal; V = vettig; T = tranig.

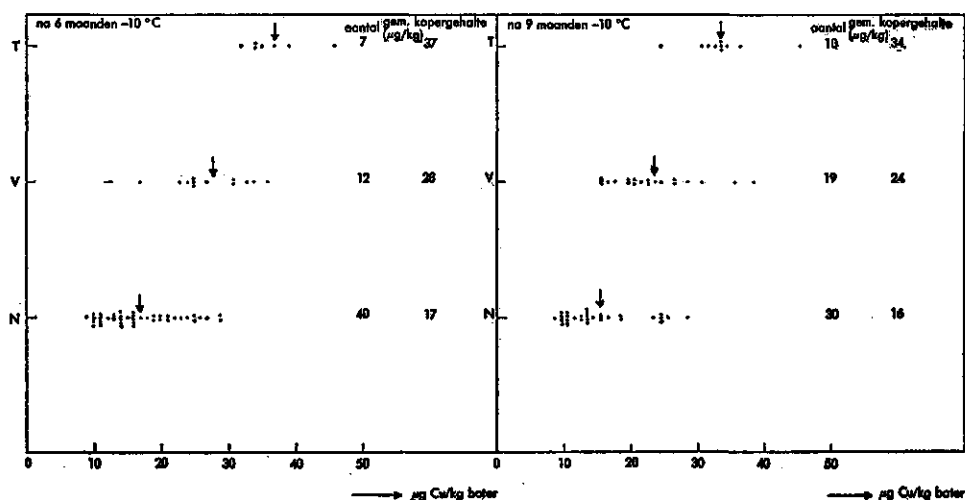


Fig. 55B. Relation between the copper contents of 59 butters from six different factories and the organoleptic scores after 6 and 9 months storage at  $-10^{\circ}\text{C}$ . N = normal; V = fatty; T = trainy.

Het risico dat de boterproducerende bedrijven nemen, indien apparatuur wordt gebruikt waardoor de in het bedrijf verwerkte melk kan worden besmet met koper, of indien melk wordt ontvangen van veehouderijen waar ze niet wordt gewonnen onder uitsluiting van koperinfecties (zeefplaatjes, melkmachines), is men zich veelal onvoldoende bewust.

### 3.2. Het verminderen van de migratie van het toegevoegde koper.

#### De invloed van het vetgehalte van de room

Over de invloed van het vetgehalte van de room op de houdbaarheid van boter bij opslag in het koelhuis is niet veel bekend. MOHR en KOENEN (1958) propageren een vetgehalte van minstens 30%; boter bereid uit té vette room ( $> 40\%$ ) zou volgens hen minder goed houdbaar zijn. Een systematisch onderzoek naar de invloed van het vetgehalte van de room op de houdbaarheid van boter is echter nimmer verricht. Dit is begrijpelijk omdat er tot dusverre geen denkbare reden was te veronderstellen dat een zodanig verband zou bestaan.

Uit een enkele jaren geleden genomen praktijkproef bleek echter dat een dergelijke



invloed toch niet uitgesloten moest worden geacht, hetgeen aanleiding was tot een nader onderzoek.

### 3.2.1. Proeven op laboratoriumschaal

Een hoeveelheid melk werd verdeeld in twee porties, aan één van deze porties werd per liter melk 40  $\mu\text{g}$  koper toegevoegd. Uit beide porties melk werd door centrifugeren room verkregen met vetgehalten van resp. 8 en 30%. Na pasteurisatie op een temperatuur van 85°C, werd gekoeld, gezuurd, gekarnd, gewassen en gekneed. De pH van de partijtjes boter was in elke serie ongeveer dezelfde. In totaal werden 6 series bereid. De partijtjes boter werden bewaard bij -10°C en gekeurd na resp. 3, 6 en 9 maanden. Tabel 31 geeft een samenvatting van de keuringsresultaten en laat zien

Tabel 31. Keuringsresultaten van partijtjes boter bereid uit room met een hoog (30%) en met een laag (8%) vetgehalte.

Soort room	Keuringsresultaten na bewaring bij -10°C gedurende								
	3 mnd			6 mnd			9 mnd		
	N	V	T	N	V	T	N	V	T
Laag vetgehalte	2	2	2	2	2	2	1	3	2
Hoog vetgehalte	5	1	-	5	1	-	2	4	-
Laag vetgehalte + koper	-	-	6	-	-	6	-	-	6
Hoog vetgehalte + koper	5	1	-	4	2	-	1	5	-

N = normaal; V = vettig; T = tranig

Table 31. *Organoleptic scores of butters made from high (30%) and low (8%) fat cream.*

Tabel 32. Keuringsresultaten van partijtjes boter bereid uit room met een hoog (35%) en met een laag (8%) vetgehalte.

Vetgehalte van de room		Laag			Hoog		
Gem. kopergehalte van de boter		85 $\mu\text{g}/\text{kg}$			59 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
Keuring na bewaring gedurende ... maanden		3	6	9	3	6	9
Keuringsresultaten	Normaal	—	—	—	5	1	1
	Vettig	5	2	1	14	17	15
	Tranig	15	18	19	1	2	4

Table 32. *Organoleptic scores of butters made from high (35%) and low (8%) fat cream.*

dat de houdbaarheid van de partijtjes boter bereid uit de koper-bevattende vette room, beter is dan die van de partijtjes boter bereid uit de overeenkomstige magere room.

Deze experimenten werden op grotere schaal herhaald. Aan de melk werd 75–100  $\mu\text{g}$  koper/kg toegevoegd, waarna uit de melk door centrifugeren room werd verkregen met vetgehaltes van resp. 8 en 35%. De room werd vervolgens op de gebruikelijke wijze verder verwerkt. In totaal werden 20 series boter bereid, de „blanco” partijtjes boter werden achterwege gelaten. De uitslagen van de keuringen zijn verzameld in tabel 32. De houdbaarheid van de uit vette room bereide partijtjes was weer aanmerkelijk beter, hetgeen ongetwijfeld in verband staat met het lagere kopergehalte van deze boter. Hierop zal nog nader worden teruggekomen.

### 3.2.2. *Proeven op technische schaal*

In de proeffabriek van het NIZO werden 4 series boter bereid, elk bestaande uit twee partijtjes boter uit room met een hoog en met een laag vetgehalte en zonder voorafgaande toevoeging van koper (blanco's) en twee partijtjes boter uit genoemde soorten room welke uit melk met een kopertoevoeging waren verkregen. De boter werd op twee opeenvolgende dagen bereid, zoals is aangegeven in tabel 33. Op beide dagen werd ongeveer 7 000 l melk verwerkt. De room werd gepasteuriseerd op 90°C; na het koelen werd gezuurd, gekarnd, gewassen en gekneed. De boter werd bewaard bij –10°C en na resp. 3, 6 en 9 maanden gekeurd.

Getracht werd de pH in elke serie zoveel mogelijk gelijk te houden. Om dit te bereiken moest de roomzuring bij enigszins verschillende temperatuur verlopen. In de laatste serie traden tamelijk grote schommelingen op; de partijtjes boter bereid uit de magere room (+ koper) hadden een hogere pH, hetgeen echter niet van invloed is geweest op de resultaten.

Behalve het vaststellen van de pH van het boterserum, werden de in tabel 33 aangegeven bepalingen uitgevoerd. De microbiologische kwaliteit van de partijtjes boter werd niet opgenomen. Deze was voor alle monsters goed, zodat geen enkele partij behoefde te worden uitgesloten van het vergelijkend onderzoek.

Uit de keuringsresultaten bleek dat er een duidelijk verband bestaat tussen het kopergehalte van de boter en de houdbaarheid. Hoewel dit na drie maanden bewaring nog niet tot uiting kwam, was de situatie na resp. 6 en 9 maanden geheel anders. Fig. 56 laat zien dat boter bereid uit vette room zich in het koelhuis zeer goed heeft gehouden: na 9 maanden waren alle partijtjes boter nagenoeg vrij van koelhuisgebreken. De gehalten aan koper waren echter zeer laag (gem. 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). De kwaliteit van de boter bereid uit magere room, was eveneens tamelijk goed. Het kopergehalte van deze partijtjes boter bedroeg gemiddeld 24  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . De keuringsresultaten van de partijtjes boter bereid uit vette room waarbij aan de melk koper was toegevoegd, waren beter dan die van de partijtjes boter bereid uit de magere room die toegevoegd koper be-

Tabel 33. Experimentele gegevens betreffende de partijtjes boter bereid uit room met een hoog en met een laag vetgehalte en de resultaten van de keuringen na bewaring gedurende respectievelijk 3, 6 en 9 maanden bij  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Productie- datum	Koper		Boter							
	toegevoegd aan de melk	Room vetgehalte	serum	eiwit	fosfatiden	koper	lactose	Keuringsresultaten na bewaring gedurende		
								3 mnd	6 mnd	9 mnd
1957	$\mu\text{g/kg}$	%	pH	%	%	$\mu\text{g/kg}$	%			
11-VII	—	26,0	4,58	0,52	0,16	15	—	normaal	iets goorkook	normaal
11-VII	—	9,8	4,54	0,68	0,19	33	—	iets goorkook	iets vettig	vettig
12-VII	75	31,6	4,53	0,50	0,16	38	0,34	iets vettig	iets vettig	vettig
12-VII	75	9,0	4,51	0,53	0,16	66	0,34	vettig-licht tranig	tranig	sterk tranig
22-VIII	—	34,7	4,51	0,45	0,20	17	—	goorkook	goorkook	iets vettig
22-VIII	—	11,3	4,55	0,56	0,18	19	—	normaal	normaal	vettig
23-VIII	75	36,1	4,54	0,45	0,20	33	0,28	metallig	vettig	vettig
23-VIII	75	8,8	4,58	0,57	0,16	57	0,32	vettig	licht tranig	tranig
2-X	—	34,1	4,59	0,44	0,21	16	—	iets goorkook	iets goorkook	iets goorkook
2-X	—	10,8	4,66	0,59	0,20	23	—	normaal	iets vettig	iets vettig
3-X	75	33,7	4,55	0,46	0,22	32	0,31	iets vettig	vettig	licht tranig
3-X	75	10,4	4,69	0,68	0,20	44	0,31	iets vettig	vettig	licht tranig
9-X	—	36,9	4,64	0,51	0,23	16	—	iets goorkook	iets goorkook	iets goorkook
9-X	—	8,5	4,94	0,63	0,15	20	—	normaal	iets vettig	iets vettig
10-X	75	34,4	4,66	0,51	0,21	36	0,31	iets goorkook	vettig	vettig-licht tranig
10-X	75	7,6	4,86	0,86	0,17	80	0,30	vettig	tranig	sterk tranig

Table 33. Experimental data concerning butters made from high and low fat cream and the organoleptic scores after storage for 3, 6 and 9 months at  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Fig. 56. De correlatie tussen de kopergehalten van 16 monsters boter (bereid uit magere en uit vette room) en de keuringsresultaten van de partijtjes boter na bewaring in het koelhuis gedurende 3, 6 en 9 maanden bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . V = vette room;  $V_k$  = vette room + koper; M = magere room;  $M_k$  = magere room + koper.

boter uit:		V	V	V	V	M	M	M	V <sub>k</sub>	M	V <sub>k</sub>	V <sub>k</sub>	V <sub>k</sub>	M <sub>k</sub>	M <sub>k</sub>	M <sub>k</sub>	M <sub>k</sub>
kopergehalte in µg/kg		15	16	16	17	19	20	23	32	33	33	36	38	44	57	66	80
3 maanden	normaal	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	vettig														■	■	■
	tranig																
6 maanden	normaal	■	■	■	■	■	■	■		■				■			
	vettig								■			■	■		■		
	tranig															■	■
9 maanden	normaal	■	■	■				■	■								
	iets vettig				■												
	vettig					■					■	■	■	■			
	tranig								■						■	■	■

Fig. 56. Correlation between the copper contents of 16 samples of butter (made from low and high fat cream) and the organoleptic scores of the butters after storage for 3, 6 and 9 months at  $-10^{\circ}\text{C}$ . V = high fat cream;  $V_k$  = high fat cream + copper; M = low fat cream;  $M_k$  = low fat cream + copper.

vatte. De gehalten aan koper bedroegen gemiddeld resp. 35 en 62  $\mu\text{g/kg}$ . De door verhoging van het vetgehalte van de room verkregen kwaliteitsverbetering van de boter is dus ongetwijfeld het gevolg van het lagere kopergehalte van deze boter.

Het verband tussen het vetgehalte van de room en het kopergehalte van de boter is niet eenvoudig te onderkennen. Er zijn verschillende factoren die mede bepalend zijn voor het uiteindelijke kopergehalte van de boter: de invloed van de behandeling van de room, de wijze van afkarnen, het al of niet wassen etc. In dit complexe geheel zijn twee factoren echter van groot belang:

- de invloed van het vetgehalte van de room op de verdeling van het toegevoegde koper over de vet- en waterfase van de room bij pH 4,6;
- de invloed van het vetgehalte van de room op het gehalte aan membraaneiwit van de boter.

In het onderstaande is aan beide factoren nader aandacht besteed.

### 3.2.3. Het verband tussen het vetgehalte van de room en het kopergehalte van de boter

Als resultaat van de experimenten betreffende de verdeling van het toegevoegde koper

in melk bij pH 4,6 kwam naar voren dat, als gevolg van de pH-verlaging, een gedeelte van het aan de plasmaeiwitten gebonden toegevoegde koper migreert naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes.

Vette room bevat méér membraaneiwit en minder plasmaeiwitten dan magere room, hetgeen betekent dat bij verlaging van de pH in vette room per gewichtseenheid membraaneiwit minder van het aan de plasmaeiwitten gebonden toegevoegde koper wordt opgenomen dan het geval is voor het membraaneiwit van magere room.

Gebaseerd op de standaardmelk (Hfdst. V. 8.) kan de volgende, globale berekening worden gemaakt:

Room met een vetgehalte van 35% bevat  $650/962 \times 32 \text{ g} = 21,6 \text{ g}$  plasmaeiwitten en ca. 3,5 g membraaneiwit. Het quotiënt plasmaeiwitten/membraaneiwit bedraagt dus 6,2. Voor room met een vetgehalte van 10% bedraagt deze waarde 29,9 (29,9 g plasmaeiwitten, 1 g membraaneiwit).

Verdeling van het koper ( $n$  = natuurlijk koper;  $t$  = toegevoegd koper):

## 1. Melk

### a. natuurlijk koper

$\text{Cu}^n$  in het oppervlaktelaagje:  $17\%$  van  $25 \mu\text{g} = 4,25 \mu\text{g}/380 \text{ mg} = 11,2 \mu\text{g}^n/\text{g}$  membraaneiwit

$\text{Cu}^n$  van de plasmaeiwitten:  $20,75 \mu\text{g}/31,62 \text{ g} = 0,7 \mu\text{g}^n/\text{g}$  plasmaeiwit

### b. toegevoegd koper (75 $\mu\text{g}$ koper/kg melk)

$\text{Cu}^t$  in het oppervlaktelaagje:  $0,75 \mu\text{g}/380 \text{ mg} = 2,0 \mu\text{g}^t/\text{g}$  membraaneiwit

$\text{Cu}^t$  van de plasmaeiwitten:  $74,25 \mu\text{g}/31,62 \text{ g} = 2,3 \mu\text{g}^t/\text{g}$  plasmaeiwit

Totaal: membraaneiwit:  $(11,2 \mu\text{g}^n + 2,0 \mu\text{g}^t)/\text{g}$

plasmaeiwitten:  $(0,7 \mu\text{g}^n + 2,3 \mu\text{g}^t)/\text{g}$

## 2. Room 10% vet, per kg:

100 g vetbolletjes: 1 g membraaneiwit

900 g plasma: 29,9 g plasmaeiwitten

## Room 35% vet, per kg:

350 g vetbolletjes: 3,5 g membraaneiwit

650 g plasma: 21,6 g plasmaeiwitten

Kopergehalte van de room:

membraaneiwit:  $11,2 \mu\text{g}^n + 2,0 \mu\text{g}^t$

plasmaeiwitten:  $20,9 \mu\text{g}^n + 68,8 \mu\text{g}^t$

Totaal:  $32,1 \mu\text{g}^n + 70,8 \mu\text{g}^t =$   
 $= 102,9 \mu\text{g}/\text{kg}$

Kopergehalte van de room:

membraaneiwit:  $39,2 \mu\text{g}^n + 7,0 \mu\text{g}^t$

plasmaeiwitten:  $15,1 \mu\text{g}^n + 49,7 \mu\text{g}^t$

Totaal:  $54,3 \mu\text{g}^n + 56,7 \mu\text{g}^t =$   
 $= 111,0 \mu\text{g}/\text{kg}$

Het kopergehalte van de vette room is dus hoger dan dat van de magere room, het gehalte aan toegevoegd koper is echter lager.

pH 4,6:

40% van plasma  $\text{Cu}^t \rightarrow$  membraaneiwit

pH 4,6:

40% van plasma  $\text{Cu}^t \rightarrow$  membraaneiwit

Per gram membraaneiwit:

$$11,2 \mu\text{g}^n + 2,0 \mu\text{g}^t + 27,5 \mu\text{g}^t = 40,7 \mu\text{g/g} \quad (39,2 \mu\text{g}^n + 7,0 \mu\text{g}^t + 19,9 \mu\text{g}^t)/3,5 = 18,9 \mu\text{g/g}$$

Plasmaeiwitten/g

$$(20,9 \mu\text{g}^n + 41,3 \mu\text{g}^t)/29,9 = 2,1 \mu\text{g/g}$$

Plasmaeiwitten/g

$$(15,1 \mu\text{g}^n + 29,8 \mu\text{g}^t)/21,6 = 2,1 \mu\text{g/g}$$

Het kopergehalte van het membraaneiwit van de magere room is dus 3,1 maal zo hoog geworden, dat van het membraaneiwit van de vette room echter slechts 1,4 maal.

3. Boter (0,6% eiwit), per kg:

1,5 g membraaneiwit: 61  $\mu\text{g}$

4,5 g plasmaeiwitten: 9  $\mu\text{g}$

Totaal: 70  $\mu\text{g/kg}$  boter

Gem. volgens tabel 33: 62  $\mu\text{g/kg}$  boter

Boter (0,6% eiwit), per kg:

1,5 g membraaneiwit: 28  $\mu\text{g}$

4,5 g plasmaeiwitten: 9  $\mu\text{g}$

Totaal: 37  $\mu\text{g/kg}$  boter

Gem. volgens tabel 33: 35  $\mu\text{g/kg}$  boter

Het gemiddelde kopergehalte van de partijtjes extra koper-bevattende boter, bereid uit room met vetgehalten van ca. 10%, bedroeg in werkelijkheid 62  $\mu\text{g/kg}$ , de waarden lagen tussen 44 en 80  $\mu\text{g/kg}$ . Voor de boter bereid uit vette room (vetgeh. ca. 35%) bedroegen deze waarden resp. 35 en 32–38  $\mu\text{g/kg}$ .

Hoewel de berekende en de experimentele waarden vrij goed overeenstemmen, moet hieraan niet een te grote betekenis worden toegekend. Zoals reeds is opgemerkt zijn er verschillende factoren die invloed uitoefenen op het kopergehalte van de boter. Dit gehalte wordt vrijwel uitsluitend bepaald door de hoeveelheid ingesloten membraaneiwit; per gram plasmaeiwit wordt het kopergehalte van de boter in dit geval slechts met 2  $\mu\text{g/kg}$  vermeerderd. In het voorgaande rekenvoorbeeld bedroeg het kopergehalte van het membraaneiwit van de magere en van de vette room, na aanzuren tot pH 4,6, resp. ca. 41 en 19  $\mu\text{g/g}$ . Kleine variaties in het gehalte aan membraaneiwit veroorzaken grote schommelingen in het kopergehalte van de boter. Dit geldt speciaal voor de boter bereid uit magere room: bij een gehalte aan membraaneiwit van resp. 1, 1,5 en 2 g/kg boter zijn de berekende kopergehalten resp. 51, 70 en 90  $\mu\text{g/kg}$  boter, indien het totale eiwitgehalte 0,6% bedraagt. Voor de boter bereid uit vette room bedragen de waarden in dat geval resp. 29, 37 en 46  $\mu\text{g/kg}$ . Variaties in het kopergehalte van de boter blijken voornamelijk op te treden in de uit de magere room bereide boter; de waarden bedroegen resp. 44, 57, 66 en 80  $\mu\text{g/kg}$  boter, voor de boter bereid uit de vette room resp. 32, 33, 36 en 38  $\mu\text{g/kg}$  (tabel 33).

Indien wij het eiwitgehalte van boter op 0,6% stellen en het gehalte aan membraaneiwit op 1,5 g/kg boter kan het kopergehalte van boter bereid uit room met verschillende vetgehalten, en gebaseerd op een toevoeging van 75  $\mu\text{g}$  koper/kg melk, worden berekend.

Fig. 57 geeft een samenvatting van de berekeningen en laat zien dat het kopergehalte van het membraaneiwit (pH 4,6) bij stijgende vetgehalten van de room, aanvankelijk sterk daalt. Parallel hiermede verloopt ook het kopergehalte van de boter.

Fig. 57. Het verband tussen het vetgehalte van room en het kopergehalte van het membraaneiwit en van de boter, na toevoeging van 75  $\mu\text{g}$  Cu/kg melk (pH 4,6).

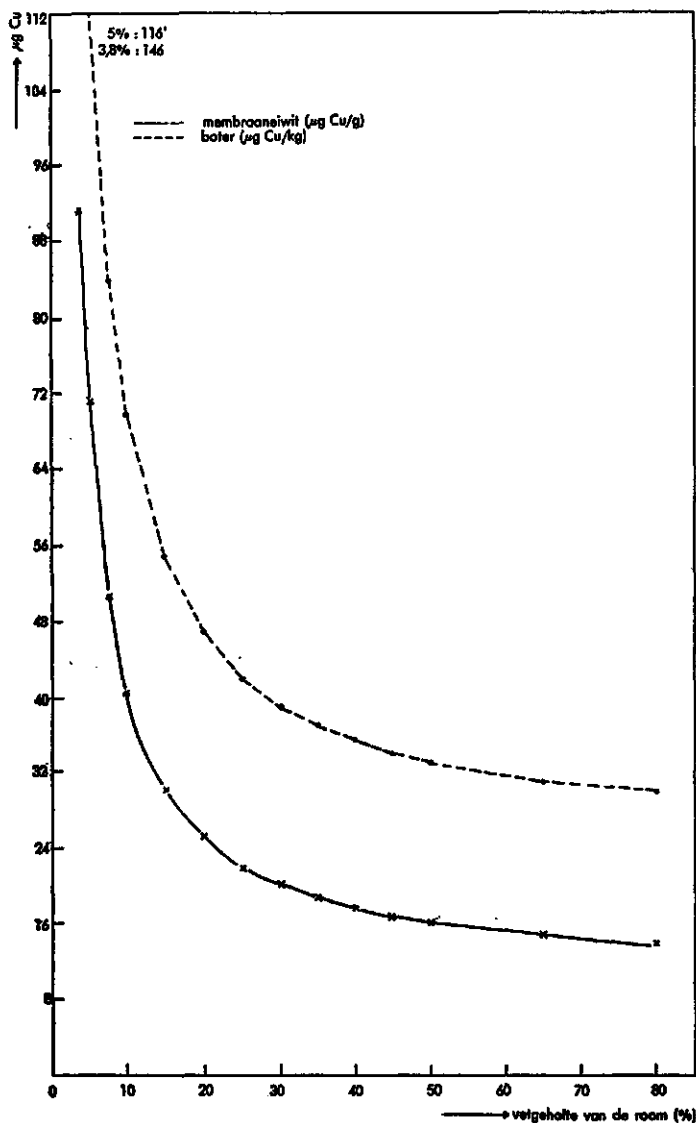


Fig. 57. Relation between the fat content of cream and the copper content of the membrane protein and of the butter, after addition of 75  $\mu\text{g}$  Cu/kg of milk (pH 4,6).

Voor boter bereid uit room met vetgehalten van resp. 5 en 80%, zou het kopergehalte theoretisch 116 en 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bedragen. Nogmaals wordt er echter op gewezen dat variaties in het kopergehalte van boter aanzienlijk kunnen zijn, vooral als van magere room wordt uitgegaan.

### 3.2.4. De invloed van het vetgehalte van de room op het gehalte aan eiwit van de boter

Over de hoeveelheid ingesloten plasmaeiwitten in boter bereid uit vette en uit magere room kan, op grond van de gehalten aan lactose, niets met zekerheid worden gezegd. De lactosegehalten van de partijtjes boter bedroegen gemiddeld resp. 0,31% (vette room) en 0,32% (magere room). De concentratie van lactose in het botervocht bedroeg dus in beide gevallen 1,94%, bij een vochtgehalte van de boter van 16%. Uit dit gegeven mag echter niet worden geconcludeerd dat de hoeveelheid ingesloten plasmaeiwitten in beide gevallen eveneens dezelfde is. De bij pH 4,6 uitgevlokte eiwitten kunnen door de boterkorrels mechanisch worden vastgehouden. De hoeveelheid plasmaeiwitten die wordt weggewassen kan verschillend zijn. Hierbij zullen de invloed van de grootte en het type van de korrel van belang zijn.

MULDER (1947, II) vond bij zijn proeven dat boter bereid uit magere room de meeste karnemelk bevatte. Het lactose- en het eiwitgehalte van deze boter waren hoger dan die van boter bereid uit de vette room.

De verschillen in kopergehalten tussen de partijtjes boter (tabel 33) bereid uit vette en magere room zonder kopertoevoeging, duiden op een verschil in gehalte aan membraaneiwit (1e serie). Hetzelfde kan worden opgemerkt bij de extra-koper-bevattende partijtjes boter van de 4e serie.

Tabel 34. De berekende hoeveelheden membraaneiwit en plasmaeiwitten in de partijtjes boter uit vette en uit magere room (tabel 33), gebaseerd op de onder 3.2.3. gegeven berekeningen.

Boter									
koper toegevoegd	Vette room				koper toegevoegd	Magere room			
	koper eiwit		membraan- eiwit	plasma- eiwitten		koper eiwit		membraan- eiwit	plasma- eiwitten
	µg/kg	g/kg				g/kg	g/kg		
—	15	5,2	1,1	4,1	—	33	6,8	2,7	4,1
	17	4,5	1,3	3,2		19	5,6	1,4	4,2
	16	4,4	1,2	3,2		23	5,9	1,8	4,1
	16	5,1	1,2	3,9		20	6,3	1,5	4,8
			1,2 (gem.)	3,6 (gem.)				1,9 (gem.)	4,3(gem.)
+	38	5,0	1,6	3,4	+	66	5,3	1,4	3,9
	33	4,5	1,4	3,1		57	5,7	1,2	4,5
	32	4,6	1,3	3,3		44	6,8	0,8	6,0
	36	5,1	1,5	3,6		80	8,6	1,6	7,0
			1,5 (gem.)	3,4(gem.)				1,3 (gem.)	5,4(gem.)

Table 34. Calculated amounts of membrane protein and of plasma proteins in butters made from high and low fat cream (table 33), based on the calculations mentioned under 3.2.3.



In tabel 34 zijn de berekende hoeveelheden membraaneiwit en plasmaeiwitten van de 16 partijtjes boter opgenomen. De berekeningen zijn gebaseerd op de onder 3.2.3. vermelde gegevens. De partijtjes boter (tabel 33) waren bereid uit melk waaraan eveneens 75  $\mu\text{g}$  koper/kg was toegevoegd, de vetgehalten bedroegen gemiddeld ca. 10 en 35%. Uit de tabel blijkt dat vooral in boter bereid uit magere room, vrij aanzienlijke verschillen in gehalte aan membraaneiwit kunnen voorkomen. De invloed hiervan op het kopergehalte van de boter is groot, daar het kopergehalte van het membraaneiwit vooral hoog is indien extra koper is toegevoegd (magere room!).

Het gehalte aan plasmaeiwitten van de partijtjes boter bereid uit magere room (zowel zonder als met extra koper) is volgens deze berekeningen hoger dan dat van de partijtjes boter bereid uit vette room.

Indien geen besmetting met koper optreedt kan een kopergehalte van ruim 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  boter voorkomen (magere room). Dit hoeft echter geen aanleiding te geven tot het ontstaan van koelhuisgebreken: voor het optreden van oxidatieve afwijkingen is in dit geval niet zozeer het totale kopergehalte van de boter de bepalende factor, doch veeleer de concentratie aan koper in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes, die in magere en vette room gelijk is.

Onder praktische omstandigheden zullen deze extreme gevallen niet dikwijls voorkomen, daar over het algemeen room wordt gekarnd met vetgehalten van 25–35%. Dit impliceert dat onder deze voorwaarde de hoeveelheid ingesloten membraaneiwit niet sterk varieert (tabel 34). Bij vetgehalten van de room van 20–35% zijn bovendien de verschillen in kopergehalte van het membraaneiwit, indien (eenzelfde) koperbesmetting van de melk is opgetreden, niet erg groot (fig. 57). Na toevoeging van 100  $\mu\text{g}$  koper/kg melk, een koperbesmetting die in de praktijk niet vaak zal voorkomen, werden waarden voor het kopergehalte van het membraaneiwit berekend van resp. 25 en 19  $\mu\text{g}/\text{g}$ , voor room met vetgehalten van resp. 20 en 35% (pH 4,6). Voor een besmetting met koper van 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  melk bedragen deze waarden resp. 21 en 16  $\mu\text{g}/\text{g}$ .

De tamelijk constante hoeveelheid membraaneiwit die wordt ingesloten in de boter, uitzonderingen betrekking hebbend op boter bereid uit magere room daargelaten, zou een verklaring kunnen geven voor de kritische waarden (16, 24 en 34  $\mu\text{g}/\text{kg}$  boter, voor resp. normale, vettige en tranige boter) die werden vastgesteld voor de houdbaarheid van boter die in het koelhuis wordt bewaard (fig. 55).

In principe zou het gehalte aan membraaneiwit van boter globaal kunnen worden berekend, gebaseerd op de verdeling van de fosfatiden tussen de vet- en waterfase van de room. Melk met een fosfatidegehalte van 0,04%, het gemiddelde gehalte van de aangevoerde melk van een tiental fabrieken, en een vetgehalte van 3,8%, bevat 240 mg fosfatiden/38 g vet. Tijdens het centrifugeren wordt ca. 20% van de aan het vet gebonden fosfatiden verwijderd. Na het centrifugeren bevatten 38 g vetbolletjes dan 200 mg fosfatiden. Room met een vetgehalte van 25% bevat dus  $250/38 \times 200 = 1316$  mg fosfatiden/250 g vet. Indien deze hoeveelheid in zijn geheel overgaat in de boter zou de uit deze room bereide boter na het karnen en kneden ongeveer  $840/250 \times$

1,316 g = 4,4 g fosfatiden/kg boter bevatten. In werkelijkheid bedraagt het fosfatidegehalte van boter ca. 0,2%.

Melk bevat ca. 1 g membraaneiwit/100 g vetbolletjes. Onder invloed van de bewerkingen die de melk ondergaat zal van dit eiwit eveneens een gedeelte worden verwijderd van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Gebaseerd op een verlies van 20%, zou de ingesloten hoeveelheid membraaneiwit bedragen:  $2/4,4 (8,4 - 1,7) = 3\text{g/kg}$  boter. Gezien in het licht van de reeds vermelde berekeningen is het niet waarschijnlijk dat boter een dergelijke hoeveelheid membraaneiwit bevat. Het gehalte aan natuurlijk koper zou in dat geval ruim  $35 \mu\text{g/kg}$  bedragen.

De verhouding eiwit/fosfatiden van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes (tabel 13) is tijdens de bewerkingen die de melk ondergaat blijkbaar niet constant. In dit verband is het vetgehalte van de room mede van belang. Het fosfatidegehalte van de partijtjes boter bereid uit magere en uit vette room was vrijwel gelijk (gemiddeld resp. 0,18 en 0,20%). De overeenkomstige gehalten aan membraaneiwit bedroegen 0,16 en 0,13% (tabel 34), de eiwit/fosfatide verhouding was dus resp. 0,89 en 0,65 (oorspr. 2, zie tabel 13).

Tabel 35. De invloed van het vetgehalte en van de pH van gewassen room op het gehalte aan membraaneiwit van de uit deze room bereide boter.

Expt. Nr.	Gewassen room			Boter	
	vetgehalte	eiwitgehalte	pH	eiwitgehalte	vochtgehalte
	%	%		%	%
1	17,6	0,11	6,6	0,19	17,0
	48,0	0,29	6,6	0,16	13,9
2	18,2	0,12	6,6	0,19	14,4
	51,8	0,37	6,6	0,12	16,1
3	17,6	0,13	4,6	0,50	16,3
	43,3	0,32	4,6	0,37	17,0
4	43,0	0,29	6,6	0,20	14,0
	43,0	0,29	4,6	0,41	18,8

Table 35. *The influence of the fat content and pH of washed cream on the amount of membrane protein in butter made from that cream.*

In tabel 35 zijn de resultaten opgenomen van een aantal experimenten die betrekking hebben op de invloed van het vetgehalte van gewassen room op het gehalte aan membraaneiwit van de boter. De invloed van het vetgehalte van de room komt duidelijk tot uiting (expt. nr. 3). Een medium van lage pH heeft een grote invloed op het uiteindelijke gehalte aan membraaneiwit (expt. nr. 4), hetgeen waarschijnlijk gedeeltelijk moet worden toegeschreven aan de hogere viscositeit van de gewassen room. Daarnaast zullen de cohesie en de karntijd eveneens van belang zijn.

# SLOTBESCHOUWING

Uit de onder 3. vermelde onderzoeken kwam als resultaat naar voren dat slechts boter met een zeer laag kopergehalte houdbaar is in het koelhuis. In de figuren 55A en 55B werd duidelijk het verband gedemonstreerd tussen het kopergehalte van de boter en de houdbaarheid. Ter nadere illustratie zijn uit fig. 55A de analyseresultaten van partijtjes boter van 20 fabrieken gelicht, waarbij in de zomer van 1957 een onderzoek werd ingesteld naar de invloed van verschillende factoren op de houdbaarheid van de boter. Deze fabrieken waren zódanig gekozen dat, volgens de gegevens uit vroegere jaren, kon worden aangenomen dat 10 van deze fabrieken goed houdbare en de anderen minder goed houdbare boter produceerden. Een en ander wordt verduidelijkt in fig. 58, waarin zijn opgenomen de kopergehalten van de partijtjes boter,

Fig. 58. Het verband tussen de kopergehalten van partijtjes boter, afkomstig van 20 bedrijven en de resultaten van de keuringen na respectievelijk 3, 6 en 9 maanden bewaring bij  $-10^{\circ}\text{C}$ .

goed: + minder goed: -		+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
kopergehalte in µg/kg		10	13	15	18	22	23	24	34	37	40	44	46	49	59	60	63	67	70	77
3 maanden	normaal	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■				■
	vettig														■			■		
	tranig																■		■	■
6 maanden	normaal	■	■	■	■	■	■	■	■											
	vettig									■	■	■	■	■		■				
	tranig														■		■	■	■	■
9 maanden	normaal (I)	■	■	■	■	■														
	vettig (II)						■	■	■											
	licht tranig (III)									■	■	■	■	■						
	sterk tranig (IV)															■	■	■	■	■

\* uitslagen van de keuringen, verricht door het Zuivel-Kwaliteitscontrole-Bureau

Fig. 58. Relation between the copper contents of butters from 20 factories and the organoleptic scores after storage for 3, 6 and 9 months at  $-10^{\circ}\text{C}$ .

de keuringsresultaten na 3, 6 en 9 maanden bewaring bij  $-10^{\circ}\text{C}$ , benevens de te verwachten indeling in goed houdbare boter (+) en minder goed houdbare boter (-). Uit deze figuur blijkt dat er bij een langdurige bewaring een zeer nauw verband bestaat tussen het kopergehalte van de boter en de houdbaarheid. De prognose „goed - minder goed” hield alleen verband met het kopergehalte van de geproduceerde boter. Na 9 maanden bewaring lag de grens voor boter in de klasse E bij 22, in klasse B bij 34 en in klasse I bij 37  $\mu\text{g}$  koper/kg boter (minimumwaarde). Bij een

nadere beschouwing van de figuren 55A, 55B en 56 blijkt dat voor 9 maanden-oude koelhuisboter globaal dezelfde grenzen gelden als in bovengenoemd geval. Als gemiddelden voor de drie klassen kunnen waarden worden gesteld van  $\leq 23$ ,  $\leq 35$  en  $> 35$   $\mu\text{g}$  koper/kg boter.

Over het algemeen wordt boter niet zo lang bewaard. Bij een normale afzet is de bewaartijd ca. 4-6 maanden, hetgeen impliceert dat de „houdbaarheidsgrenzen” op een iets hoger niveau komen te liggen. Zo zullen de waarden voor 4-6 maanden-oude koelhuisboter globaal 10-15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hoger liggen dan die voor 9 maanden-oude boter. Hierbij moet echter rekening worden gehouden met de mogelijkheid dat boter, met een voor een lange houdbaarheid te hoog kopergehalte, bij vroegtijdige uitslag uit het koelhuis toch snel bederft, als gevolg van een reeds aangevangen initiële peroxydvorming.

Uit het jaarverslag van het ZKB over 1960 blijkt dat ca. 80% van ruim 2 400 monsters boter, afkomstig van alle Nederlandse zuivelbedrijven, een kopergehalte had van  $\leq 60$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Het gemiddelde kopergehalte van de Nederlandse boter bedroeg in 1960 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . De door het ZKB gehanteerde norm betreffende het kopergehalte van boter is gesteld op resp. 70 en 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , voor de perioden van resp. 1/5-31/10 en van 1/11-30/4. De vraag kan worden gesteld of deze grens niet te hoog ligt, vooral wanneer boter bij onvoldoende afzetmogelijkheden langer moet worden bewaard.

De experimenten waarbij onder normale bedrijfsomstandigheden boter werd bereid uit melk waaraan 75  $\mu\text{g}$  koper/kg was toegevoegd, hebben aangetoond dat, indien boter wordt bereid uit vette room, het kopergehalte van de boter ver beneden deze grens kan liggen. Zelfs het kopergehalte van de boter die werd bereid uit magere room met toegevoegd koper lag beneden deze waarde. Een aanzienlijke besmetting met koper is dus mogelijk zonder dat de gestelde grens wordt overschreden.

Een verdere verlaging van deze grens dient echter niet zóver te gaan dat de bedrijven worden gedwongen hun bereidingswijze ingrijpend te veranderen. Fig. 56 laat zien dat het mogelijk is boter te bereiden met een kopergehalte van 33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , indien wordt uitgegaan van magere room zonder kopertoevoeging. Uit melk waaraan 75  $\mu\text{g}$  koper/kg is toegevoegd kan eveneens boter worden bereid met hetzelfde kopergehalte (vette room). Indien echter de aangevoerde melk niet met koper is besmet en indien ook tijdens de verwerking geen koperbesmetting optreedt, zal een verschil in vetgehalte van de room geen invloed uitoefenen op de houdbaarheid van de boter. In beide gevallen is het kopergehalte van het membraaneiwit, na aanzuren van de room tot pH 4,6 hetzelfde, omdat er geen migratie optreedt van het natuurlijke koper. Verschillen in gehalte aan membraaneiwit van de boter en dus in kopergehalte, als gevolg van verschillen in bereidingswijze, moeten in dit geval toelaatbaar zijn. Het gevaar is echter niet denkbeeldig dat bedrijven zich verschuilen achter een, naar algemene maatstaven, redelijk kopergehalte, hoewel toch een aanzienlijke besmetting met koper, hetzij op de boerderij, hetzij in het bedrijf, heeft plaatsgehad.

Tenslotte kan over het door het ZKB getolereerde verschil in kopergehalte tussen zomer- en winterboter nog worden opgemerkt dat een dergelijk onderscheid weinig

zinnig is. In Hfdst. V. 3.2.2. werd gesteld dat het kopergehalte van het membraaneiwit van melk van nieuwmelkse koeien gemiddeld niet afwijkt van dat van melk van normale koeien. De aangevoerde melk kan evenwel, vooral in de maanden november-april een iets verhoogd kopergehalte hebben. Dit kan echter vrijwel niet van invloed zijn op het kopergehalte van de boter. Daar bij verlaging van de pH geen migratie optreedt van het natuurlijke koper, zal zowel voor gemengde melk met nieuwe melk als voor normale gemengde melk het kopergehalte van het membraaneiwit in aangezuurde room dezelfde zijn. Kleine variaties in het kopergehalte van de boter zijn echter steeds mogelijk, daar de hoeveelheid ingesloten membraaneiwit in beide gevallen niet gelijk hoeft te zijn.

Het (gelegaliseerde) verschil in kopergehalte tussen stal- en weideboter vindt voornamelijk zijn oorzaak in besmetting met koper, waarvan de gevolgen in de winterperiode (minder melk) groter zijn. Dit blijkt ook uit het feit dat het verschil in kopergehalte tussen zomer- en winterboter in de loop der jaren is gedaald. In de jaren 1958, 1959 en 1960 bedroegen de gemiddelde kopergehalten van winter- en zomerboter resp. 72, 70, 58 en 46, 46 en 41  $\mu\text{g/kg}$ . Het kopergehalte van winterboter (minder melk) blijkt sterker gedaald dan dat van zomerboter (méér melk).

#### 4. HET DOEN ONTSTAAN OF TOEVOEGEN VAN ANTIOXIDANTEN

##### 4.1. Vorming van SH-groepen

Het is algemeen bekend dat tijdens het verhitten van melk reducerende verbindingen („actieve” SH-groepen) worden gevormd. Men bevordert doelbewust het ontstaan van deze verbindingen bij de bereiding van bijv. melkpoeder en boter, door de melk of room op hoge temperatuur te verhitten. Hierdoor wordt de (chemische) duurzaamheid van het eindproduct verbeterd. De gunstige invloed van de gevormde reducerende verbindingen op de houdbaarheid vindt zijn verklaring in het feit dat ze werkzaam zijn als antioxidanten.

Onder Hfdst. I. 4.6. werden de resultaten vermeld van een onderzoek van VAN HAEFTEN en PETTE, waarbij werd gewezen op het feit dat de houdbaarheid van boter bereid uit hoog gepasteuriseerde room, beduidend beter was dan die van boter bereid uit laag gepasteuriseerde room. Indien onder geheel vergelijkbare omstandigheden wordt gewerkt, is het aantonen van een eventueel verband tussen de pasteurisatietemperatuur van de room en de houdbaarheid van de boter op een vrij eenvoudige wijze te realiseren. Moeilijker wordt het echter indien een dergelijk verband moet worden opgespoord onder omstandigheden die van bedrijf tot bedrijf variëren. Dit wordt geïllustreerd door een onderzoek dat werd ingesteld in een twintigtal fabrieken. Om de intensiteit van de pasteurisatie van de room te karakteriseren werd gebruik gemaakt van de methode van JOSEPHSON en DOAN (1939). Deze berust op de beoordeling van de kleur welke optreedt indien nitroprussiednatrium en ammonia worden

toegevoegd aan met ammoniumsulfaat behandeld boterserum. De intensiteit van de roze-rode kleur correleert met de intensiteit van de warmtebehandeling van de melk (Koops, 1960b). De gevormde kleur werd vergeleken met een standaardreeks van 7 kleuren (0 t/m 6).

Tabel 36. Het verband tussen de organoleptische kwaliteit van koelhuisboter (na 6 maanden bewaring bij  $-10^{\circ}\text{C}$ ) en de SH-reactie van het verse boterserum (vgl. fig. 58).

SH-reactie van de boter in de klassen			Kopergehalte van de boter in de klassen		
normaal-iets vettig	vettig	tranig	normaal-iets vettig	vettig	tranig
			$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$
5	4	2	24	37	63
6	2	2	10	44	77
3	3	1	22	46	77
3	4	4	18	40	67
4	2	2	15	60	70
5	3	3	13	49	59
4			23		
4			34		
gem. 4,3	3,0	2,3	20	46	69

Table 36. *Relation between the organoleptic score of cold stored butter (after 6 months at  $-10^{\circ}\text{C}$ ) and the SH-reaction of the fresh butter serum (compare fig. 58).*

Tabel 36 geeft een overzicht van de SH-reactie van de verse boter en de organoleptische kwaliteit van de koelhuisboter, na bewaring gedurende 6 maanden bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . De gemiddelde SH-reactie van de goed houdbare partijtjes boter was beduidend hoger dan die van de vette, resp. tranige partijtjes boter. Een verband kon evenwel niet worden gelegd, daar ook de kopergehalten in deze klassen aanzienlijke verschillen toonden. De spreiding in de SH-reactie wekt de indruk dat deze factor slechts van ondergeschikt belang is.

## 4.2. Het toevoegen van antioxidanten

### 4.2.1. Inleiding

Onder Hfdst. IV. 3.6.2. werden enkele opmerkingen gemaakt over de invloed van een tiental verbindingen op de oxidatie van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes. Daarbij kwam naar voren dat sommige verbindingen in staat zijn het koper te verwijderen van het oppervlaktelaagje, waardoor oxidatie wordt voorkomen. Andere verbindingen, zoals BHA, BHT en NDGA kunnen, ondanks het feit dat ze geen

koperbindende eigenschappen bezitten, toch de oxidatie van het oppervlaktelaagje remmen.

Reeds eerder werd gewezen op het feit dat de resultaten die werden verkregen met modelsystemen niet zonder meer gelden voor boter. Het is niet zeker, dat verbindingen die de oxidatie van het oppervlaktelaagje remmen, ook in boter hun invloed kunnen doen gelden. In dit verband is het belangrijk dat de toegevoegde verbindingen in staat moeten zijn bij pH 4,6 het aan het membraaneiwit gebonden koper te verwijderen, waarvoor zowel in vet als in water oplosbare koperchelerende verbindingen kunnen worden aangewend. Van in vet oplosbare antioxidanten die geen koper binden kan in principe niet worden verwacht dat ze in staat zijn het oxidatieproces te remmen, daar immers de oxidatie wordt geïnitieerd via de waterfase. Verder kunnen in water oplosbare verbindingen door direct opnemen van de zuurstof een vertragende invloed uitoefenen op het ontstaan van koelhuisgebreken.

In het volgende is nader aandacht besteed aan de invloed van een aantal verbindingen op de houdbaarheid van koelhuisboter. De experimenten hadden ten doel het inzicht in het mechanisme van het ontstaan van koelhuisgebreken te verdiepen. Toevoeging van antioxidanten is wettelijk niet geoorloofd en is ook niet noodzakelijk, indien voldoende zorg wordt besteed aan het elimineren van elke potentiële bron van koperbesmetting.

#### *4.2.2. Proefseries*

De bij het onderzoek betrokken antioxidanten werden in een viertal groepen ingedeeld:

- A. Specifiek koperchelerende verbindingen: natriumdiethyldithiocarbamaat (NaDDC), rubeaanzuur en dithizon (zie tabel 37).
- B. Verbindingen waarvan, of op grond van literatuurgegevens of blijkens de remming van de oxidatie van ascorbinezuur (zie tabel 37), kan worden verwacht dat ze koperbindende eigenschappen bezitten: carboxymethylmercaptobarnsteenzuur (CMMBZ), quercetine, het dinatriumzout van ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA), histidine, kaliumjodide, kaliumjodide + histidine en citroenzuur.
- C. Verbindingen die geen koper inactiveren:
  - 1. in vet oplosbaar: BHA, BHT
  - 2. in water oplosbaar: tannine
- D. Enzymen of „geactiveerde” SH-groepen bevattende eiwitten: lactivase, glucose-oxidase-katalase en verhitte wei-eiwitten.

#### *4.2.3. Resultaten*

##### *4.2.3.1. Serie A*

Gezuurde room werd betrokken van de NIZO-proeffabriek, het vetgehalte varieerde van 25-35%. Koper werd gedoseerd in de vorm van kopersulfaat, de onder-

Tabel 37. De binding van koper aan een aantal verbindingen, onderzocht volgens de ascorbinezuur-methode.

Verbinding - 2 mg	Toegevoegd koper	Gebonden koper	Gebonden koper
	$\mu\text{g}$	$\mu\text{g}$	%
NaDDC	4,0	4,0	100
rubeaanzuur	4,0	4,0	100
dithizon	4,0	4,0	100
quercetine	4,0	4,0	100
EDTA	4,0	4,0	100
histidine	4,0	3,0	75
kaliumjodide	4,0	3,9	97,5
BHA	4,0	0,0	0
BHT	4,0	0,0	0
tannine	4,0	0,0	0

Table 37. *Binding of copper to various compounds, investigated by the ascorbic acid method.*

zochte verbindingen werden vlak voor het karnen toegevoegd aan de gezuurde room.

Tabel 38 geeft een samenvatting van de resultaten. Uit deze tabel blijkt dat zowel het in water oplosbare NaDDC, als de in vet oplosbare verbindingen rubeaanzuur en dithizon in staat zijn in uiterst geringe concentraties de ontwikkeling van koelhuisgebreken te voorkomen. In alle gevallen ontstond echter een afwijkende smaak. Naar analogie van de wijze waarop TATD werkzaam is in boter (TOLLENAAR, 1953), is het zeer waarschijnlijk dat zowel NaDDC als rubeaanzuur en dithizon het koper binden en meenemen in de vetfase.

#### 4.2.3.2. Serie B

De resultaten van de experimenten, waarbij aan partijtjes boter de in serie B genoemde verbindingen werden toegevoegd, zijn niet opgenomen in tabellen. De keuringsresultaten waren van dien aard dat, ter vermindering van te veel negatieve gegevens, voor alle onderzochte verbindingen wordt volstaan met een korte vermelding van de desbetreffende resultaten.

1. *CMMBZ*. Op dezelfde wijze als hiervoor is beschreven, werden partijtjes boter bereid waaraan verschillende hoeveelheden *CMMBZ* werden toegevoegd: blanco's 3×, 0,02% 3×, 0,04% 3×, 0,08% 3× en 0,16% 1× (percentages, berekend op de room). Koperdosering: 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  room. Uit de keuringsresultaten na 3, 6 en 9 maanden bewaring van de boter bij  $-10^{\circ}\text{C}$  bleek dat *CMMBZ* het ontstaan van koelhuisgebreken niet kan voorkomen. Blijkbaar is het *CMMBZ*, dat in de literatuur wordt



Tabel 38. De invloed van NaDDC, rubeaanzuur en dithizon op de houdbaarheid van koelhuisboter.

Serie	Room, koper toege- voegd	Antioxidant		Keuringsresultaten na ... mnd bij $-10^{\circ}\text{C}$ (N = normaal, V = vettig, T = tranig)			Opmerkingen
		naam	conc.	3	6	9	
	$\mu\text{g/kg}$		%				
I t/m V	75	NaDDC, in water. Conc. berekend op de room	— (5 ×)	V	T	T	toenemende bijsmaak
			0,0005	N*	N	N	
			0,001 (4 ×)	N	N	N	
			0,002	N	N	N	
			0,003	N	N	N	
			0,005 (3 ×)	N	N	N	
			0,007	N	N	N	
			0,01 (3 ×)	N	N	N	
			0,02	N	N	N	
VI t/m VII	75	Rubeaanzuur, in ethanol. Conc. berekend op het melkvet	— (2 ×)	T	T	T	rubberachtig
			0,0005	N	N	N	
			0,001 (2 ×)	N	N	N	
			0,004	N	N	N	
			0,005	N	N	N	
			0,008	N	N	N	
VIII	75	Dithizon, in ethanol. Conc. berekend op het melkvet	—	V	T	T	af- wijkend
			0,0005	N	N	N	
			0,001	N	N	N	
			0,005	N	N	N	

\* normaal, d.w.z. géén koelhuisgebrek

Table 38. The influence of NaDDC, rubeanic acid and dithizone on the keeping quality of cold stored butter.

vermeld als een zeer werkzame „metal scavenger” (EVANS c.s., 1954), niet in staat het koper van het membraaneiwit te verwijderen.

2. *Quercetine*. Uit verschillende porties gezuurde room, waaraan variërende hoeveelheden koper waren toegevoegd (50–100  $\mu\text{g}$  koper/kg), werden 48 partijtjes boter bereid. Quercetine werd toegevoegd aan de gezuurde room, de percentages zijn berekend op het vet van de room: blanco's 10 ×, 0,0005 % 2 ×, 0,001 % 6 ×, 0,005 % 8 ×, 0,01 % 10 ×, 0,02 % 5 ×, 0,03 % 4 × en 0,05 % 3 ×.

De keuring van de partijtjes boter geschiedde weer na 3, 6 en 9 maanden bewaring bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . Uit de resultaten bleek dat het in vet oplosbare quercetine (3, 5, 7, 3', 4'-pentaoxyflavon), hoewel het behalve koperchelerende eigenschappen eveneens die van primair antioxidant bezit, vrijwel geen invloed had op het ontstaan van koelhuis-

gebreken. Concentraties  $\geq 0,01\%$  gaven een zeer geringe bescherming gedurende de eerste 3 maanden van bewaring.

3. *EDTA*. In totaal werden 17 partijtjes boter bereid uit gezuurde room waaraan  $75\text{ }\mu\text{g}$  koper/kg was toegevoegd. Blanco's  $4\times$ ,  $0,001\%$   $3\times$ ,  $0,005\%$   $4\times$ ,  $0,01\%$   $4\times$ ,  $0,02\%$   $1\times$  en  $0,1\%$   $1\times$ . Uit de keuringsresultaten (na 3, 6 en 9 maanden) bleek, dat EDTA in concentraties  $\geq 0,01\%$  (berekend op de room) een zeer geringe bescherming gaf tegen het ontstaan van koelhuisgebreken. Er trad echter een duidelijk afwijkende smaak op.

4. *Histidine*. Blijkens tabel 37 bezit histidine koperchelerende eigenschappen. Toevoeging van histidine aan gezuurde room in concentraties van resp.  $0,001\%$ ,  $0,005\%$ ,  $0,01\%$  en  $0,05\%$  (berekend op de room, waaraan  $75\text{ }\mu\text{g}$  koper/kg was toegevoegd) had geen invloed op het ontstaan van koelhuisgebreken.

5. *Kaliumjodide*. 6. *Kaliumjodide + histidine*. Hansen's Lab. Ltd. Copenhagen brengt een antioxidant in de handel dat als werkzaam bestanddeel kaliumjodide bevat. Toevoeging van kaliumjodide in concentraties van resp.  $0,0005\%$   $1\times$ ,  $0,001\%$   $2\times$ ,  $0,005\%$   $2\times$  en  $0,01\%$   $2\times$ , had voor de concentratie van  $0,01\%$  (berekend op de room) een zeer lichte verbetering van de kwaliteit tengevolge, indien  $75\text{ }\mu\text{g}$  koper/kg room was toegevoegd. Na toevoeging van  $100\text{ }\mu\text{g}$  koper/kg room was van een betere houdbaarheid echter geen sprake. Dit gold eveneens voor kaliumjodide + histidine.

7. *Citroenzuur*. Ook citroenzuur bezit koperbindende eigenschappen. Dosering van citroenzuur aan gezuurde room waaraan  $75\text{ }\mu\text{g}$  koper/kg room was toegevoegd, in concentraties van  $0,001\%$   $1\times$ ,  $0,01\%$   $2\times$ ,  $0,05\%$   $1\times$ ,  $0,1\%$   $3\times$ ,  $0,2\%$   $1\times$  en  $0,3\%$   $1\times$ , verbeterde de kwaliteit van de boter niet. Na toevoeging van resp.  $0,1$ ,  $0,2$  en  $0,3\%$  citroenzuur (berekend op de room), daalde de pH van  $4,40$  (blanco) naar resp.  $4,30$ ,  $3,90$  en  $3,80$ , hetgeen een ongunstige invloed had op de houdbaarheid van de boter.

#### 4.2.3.3. Serie C

1. *BHA en BHT*. De antioxidanten werden opgelost in ethanol ( $72\%$ ) en toegevoegd aan gezuurde room (met  $75\text{ }\mu\text{g}$  toegevoegd koper/kg) in concentraties van  $0,001$ – $0,05\%$ , berekend op het vet van de room. In totaal werden tweemaal 16 partijtjes boter gemaakt. Geen van beide in vet oplosbare antioxidanten kon het ontstaan van koelhuisgebreken voorkomen.

2. *Tannine*. Tannine werd opgelost in water en gekookt om een directe smaakafwijking van de room als gevolg van deze toevoeging tegen te gaan. In totaal werden 7 partijtjes boter bereid, waarbij aan de gezuurde room  $75\text{ }\mu\text{g}$  koper/kg en tannine in concentraties van  $0,001$ – $0,02\%$  (berekend op de room) werden toegevoegd. Tannine had geen invloed op het ontstaan van koelhuisgebreken.

#### 4.2.3.4. Serie D

1. *Lactivase*. Lactivase is een enzym bereid uit pancreas. Het veroorzaakt in melk een geringe eiwithydrolyse, waardoor de melk wordt beschermd tegen het ontstaan van oxidatiesmaak (RIEL, 1952; FORSTER c.s., 1953). Een hoeveelheid van 20 mg/kg melk zou daarvoor voldoende zijn. Deze werkwijze, waarbij de melk na toevoeging van het enzym wordt gepasteuriseerd, wordt in verschillende delen van Amerika met succes toegepast.

Melk werd gedoseerd met koper, waarna ze werd gecentrifugeerd. De room werd in 2 porties verdeeld, één van deze porties werd in een waterbad opgewarmd tot 32°C, waarna 20 mg lactivase/kg room werd toegevoegd. De room werd vervolgens opgewarmd met een snelheid van 1°C/min. Na 30 min was een temperatuur van 62°C bereikt. De room werd vervolgens gedurende 30 min op deze temperatuur gehouden. Na koeling werd gezuurd en op de normale wijze gekarnd. De portie room waaraan géén lactivase was toegevoegd werd op dezelfde wijze behandeld. In totaal werden 3 series bereid, waarbij aan de melk resp. 30, 50 en 70 µg koper/kg werd toegevoegd. Het enzym bleek de houdbaarheid van de boter iets te verbeteren. Als gevolg van de eiwithydrolyse trad echter een afwijkende smaak op.

Het geleidelijk opwarmen van de room tot 62°C vóór de standpasteurisatie is onder bedrijfsomstandigheden geen efficiënte werkwijze. Het experiment werd daarom op een andere wijze herhaald. Aan 5 l rauwe wei werd 2 g lactivase toegevoegd, waarna de wei gedurende 45 min op 25°C werd gehouden. Vervolgens werd ze in 30 min opgewarmd tot 74°C, afgekoeld en verstoven. Het aldus verkregen wei-poeder werd toegevoegd aan gezuurde room (met 100 µg toegevoegd koper/kg) in, op de room berekende, concentraties van 0,05–0,7% (12 monsters). De uit deze room verkregen partijtjes boter bleken geen verbeterde houdbaarheid te hebben ten opzichte van de controleboter.

2. *Glucoseoxidase-katalase*. In de levensmiddelenindustrie wordt deze combinatie van enzymen voor verschillende doeleinden gebruikt (UNDERKOFER, 1960). Zo wordt uit glucose bij kamertemperatuur in het pH-gebied 4,0–6,5 snel gluconzuur gevormd, waarbij H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ontstaat dat door katalase wordt omgezet in H<sub>2</sub>O en O<sub>2</sub>. Glucoseoxidase-katalase kan zowel worden toegepast voor de verwijdering van glucose (eipoeder) als voor het elimineren van zuurstof (mayonnaise, melkpoeder).

De eerste proefserie bestond uit 32 partijtjes boter. Aan de gezuurde room met toegevoegd koper (50–80 µg/kg) werden glucoseoxidase-katalase (250–3500 eenheden/kg) en glucose (0,5–4 g/kg) toegevoegd; daarna werd gekarnd. De partijtjes boter werden 1 dag bij 13°C bewaard en vervolgens opgeslagen bij –10°C. Uit de keuringsresultaten na 3, 6 en 9 maanden bewaring bleek dat van een verbeterde houdbaarheid geen sprake was.

Daar glucose zeer snel wordt omgezet, was het gevaar niet denkbeeldig dat bij de beëindiging van het karnproces geen glucose meer aanwezig was. Daarom werden bij een tweede proefserie substraat en enzym aan de boter toegevoegd en vervolgens

ingekneed. De room met toegevoegd koper ( $75 \mu\text{g/kg}$ ) werd gekarnd, waarna aan de nog niet-geknede boter per kg hoeveelheden enzym en substraat werden toegevoegd variërende van 0,5–2 ml ( $750 \text{ eenheden/ml}$ ) en 0,5–3 g glucose. De boter werd vervolgens afgewerkt, 1 dag bewaard bij  $13^\circ\text{C}$  en daarna opgeslagen bij  $-10^\circ\text{C}$ . In totaal werden 12 partijtjes boter bereid. Uit de keuringsresultaten kwam naar voren dat het enzym in een concentratie van 2 ml/kg boter, onder toevoeging van 2 g glucose, de houdbaarheid van resp. 3, 6 en 9 maanden bewaarde boter aanzienlijk verbeterde. De boter had echter een afwijkende zure smaak.

**3. Wei-eiwitten.** Toevoeging van verhitte wei-eiwitten aan boter, waardoor het gehalte aan SH-groepen wordt verhoogd, zou in principe het ontstaan van koelhuisgebreken kunnen remmen. Om dit na te gaan, werden aan boter uit leibwei verkregen eiwitten toegevoegd. De wei werd 10 min op  $96^\circ\text{C}$  verhit, de geprecipiteerde wei-eiwitten werden in een klein volume water opgenomen en toegevoegd aan de room (vóór het karnen) of aan de boter (inkneden). De hoeveelheid geprecipiteerd eiwit werd berekend uit de stikstofanalyses in de wei vóór en na het verhitten (Kjeldahl). In totaal werden 84 partijtjes boter bereid, waarbij aan de room  $50\text{--}75 \mu\text{g}$  koper/kg werd toegevoegd. De concentratie aan wei-eiwitten varieerde van 0,05–0,5% (berekend op de boter). Er viel in de bij  $-10^\circ\text{C}$  bewaarde boter echter vrijwel geen verbetering in kwaliteit te bespeuren.

#### SLOTBESCHOUWING

Het ontstaan van koelhuisgebreken in boter kan worden voorkomen door toevoeging van verbindingen die in staat zijn koper te verwijderen van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes (serie A). Hiervoor zouden in principe zowel in vet als in water oplosbare verbindingen kunnen worden toegepast.

De in vet oplosbare antioxidanten BHA en BHT hebben in boter geen enkel effect met betrekking tot de remming van het ontstaan van koelhuisgebreken. In overeenstemming hiermede constateerde TOLLENAAR (1953) dat na toevoeging van (in vet oplosbare) gallaten aan boter, wel het peroxidegetal van het vet laag bleef, doch dat het gebrek tranig niet kon worden voorkomen. Op grond van deze waarnemingen mag volgens TOLLENAAR worden gesteld, dat primair oxidaties aan het grensvlak vet/water plaats hebben. Als gevolg van de oxidatie van de onverzadigde vetzuren van de membraanfosphatiden, treedt ook initiatie van de vetoxidatie op. Daardoor stijgt het peroxidegetal van het vet. Deze stijging kan worden geremd door in vet oplosbare antioxidanten (BHA, BHT, gallaten) toe te voegen. De secundaire oxidatie blijft dan uit; koelhuisgebreken treden echter wel op. Toevoeging van in vet of water oplosbare koperchelerende verbindingen of het direct afvangen van de voor oxidatie benodigde zuurstof (glucoseoxidase-katalase) voorkomt primaire oxidatie, waardoor het ontstaan van koelhuisgebreken wordt verhinderd. Daar het botervet zelf veel minder gevoelig is voor oxidatie, blijft nu ook de secundaire oxidatie van het vet uit.

## 5. HET VROEGTIJDIG AANTONEN VAN OXIDATIEF BEDERF

### 5.1. Inleiding

Het is tot nu toe nog niet gelukt een „prognose-proef” te ontwikkelen, die de houdbaarheid van boter in het koelhuis van te voren of in een vroegtijdig stadium laat onderkennen. Het organoleptisch onderzoek naar in boter voorkomende oxidatieve smaakgebreken is gevoeliger dan de chemische methoden die voor het signaleren van deze gebreken zijn ontwikkeld. Dit neemt echter niet weg dat moet worden getracht een methode te vinden die „vóórligt” op de organoleptische beoordeling.

In eerste instantie zou de oplossing kunnen worden gezocht in het vaststellen van het kopergehalte van voor opslag bestemde boter. De daarvoor toegepaste methode is betrouwbaar, doch onder praktische omstandigheden te tijdrovend, daar aan de uitvoering van de analyse veel aandacht moet worden besteed. Zeer recent werd echter door VAN DUIN (1963) een betrouwbare en snelle methode ontwikkeld, waardoor selectie naar kopergehalte van in het koelhuis te plaatsen boter mogelijk is geworden.

Het versnellen van het oxidatieproces door verhitting van vet op temperaturen van 100–110°C onder nauwkeurig gestandaardiseerde omstandigheden, ten einde de inductieperiode vast te stellen („Swift stability test”), mag voor vetten van betekenis zijn, voor boter waarbij naast de vetfase een waterfase aanwezig is, komt deze methode niet in aanmerking. Bovendien wordt de houdbaarheid van boter in het koelhuis niet bepaald door de stabiliteit van het botervet. Zo constateerde TOLLENAAR (1953) dat TMTD en TATD de stabiliteit van botervet verminderden en dat de houdbaarheid van boter aanzienlijk werd verbeterd.

Over de methode waarbij gebruik wordt gemaakt van het peroxidegetal van het vet kan het volgende worden opgemerkt. Hoewel hoge peroxidewaarden over het algemeen correleren met een slechte organoleptische kwaliteit, betekent dit niet dat lage peroxidewaarden een indicatie zijn voor een goede organoleptische waardering. ALIFAX (1957) stelde vast dat tussen de waarde van dit getal en de organoleptische keuringsresultaten in extreme gevallen wel verband bestaat, doch dat deze relatie voor boter met een geringe(re) smaakafwijking vaak niet kan worden gelegd.

Methoden waarbij gebruik wordt gemaakt van het feit dat destillaten van autoxiDERende vetten spectrale veranderingen vertonen in het infrarode gebied voordat organoleptische veranderingen optreden (HENICK, 1951), of waarbij polarografie wordt toegepast ten einde de gevormde hydroperoxiden kwantitatief te bepalen (RICCIUTI c.s., 1955), komen eveneens niet in aanmerking voor de praktijk.

Ruim tien jaar geleden werd voor het eerst de reactie met 2-thiobarbituurzuur (TBA) toegepast om de graad van oxidatie van verschillende vetten nader te karakteriseren. TBA vormt o.m. met oxidatieprodukten van onverzadigde vetzuren een rode verbinding (DAHLE c.s., 1962), waarvan de hoeveelheid colorimetrisch of spectrofotometrisch kan worden gemeten. Alle bepalingsmethoden met TBA komen hierin overeen, dat ze berusten op het verhitten van het te onderzoeken substraat met het reagens

in een sterk zuur milieu. De wijze waarop in dit milieu de kleurreactie van 2-thiobarbituurzuur met carbonylverbindingen verloopt, is nog niet geheel duidelijk. Het onderzoek hiernaar is nog niet afgesloten (TÄUFEL en ZIMMERMANN, 1961; TARLADGIS c.s., 1962). Het is echter gebleken dat er voor verschillende vetbevattende produkten verband bestaat tussen de TBA-waarde en de organoleptische waardering.

DUNKLEY (1951) toonde aan dat de TBA-waarden van monsters melk die in verschillende mate waren geoxideerd, zeer nauw correleerden met de organoleptische waarderingscijfers. BIGGS en BRYANT (1953) pasten deze reactie toe op boter en melkpoeder en stelden vast dat met behulp van deze reactie oxidatieverschijnselen konden worden waargenomen beneden het niveau van de organoleptische gevoeligheid.

RAMOS-CORDOVA en CONTRERAS (1959) publiceerden de resultaten van een onderzoek waaruit werd geconcludeerd dat het in principe mogelijk zou zijn, aan de hand van kleine stijgingen in TBA-waarde van boter, te komen tot het selecteren van boter naar geschiktheid voor langdurige opslag in het koelhuis. Hun resultaten waren de aanleiding tot een nader onderzoek.

## 5.2. Het verband tussen de organoleptische beoordeling van koelhuisboter en de TBA-waarde

Verse boter werd betrokken van 28 over het gehele land verspreide fabrieken. De helft van deze bedrijven zou volgens beschikbare gegevens goed houdbare, de andere helft minder goed houdbare boter produceren. De partijtjes boter werden bewaard bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . Iedere 3 weken werden van alle monsters de TBA-waarde en de organoleptische kwaliteit bepaald.

De reactie met 2-thiobarbituurzuur werd op de volgende wijze uitgevoerd: 10 g boter (temp. ca.  $3^{\circ}\text{C}$ ) werd in een centrifugebuisje verwarmd tot ongeveer  $40^{\circ}\text{C}$ , waarna 12 ml TBA-reagens (0,025 M TBA in 1 M fosforzuur) werd toegevoegd. Vervolgens werd gedurende 1 min krachtig geschud, waarna precies 10 min werd verhit in water van  $100^{\circ}\text{C}$ , onder voortdurend roeren. Na koeling tot  $40^{\circ}\text{C}$  werd 3 min gecentrifugeerd (3 000 omw./min). Vervolgens werd een glasstaafje in de centrifugebuis gezet, waarna de inhoud van de buis snel werd gekoeld tot het vet vast was geworden. De glasstaaf werd verwijderd en door de smalle opening in de vetlaag werd een pipet in de onderstaande vloeistoflaag gestoken. Van deze laag werd 10 ml afgepipetteerd in een andere centrifugebuis. Na toevoeging van 15 ml isoamylalcohol-pyridine (2 : 1, v/v) werd gedurende 1 min geschud en vervolgens werd er 3 min gecentrifugeerd. De enigszins troebele bovenstaande vloeistoflaag werd overgebracht in een andere centrifugebuis. Na toevoeging van een weinig watervrij natriumsulfaat werd nogmaals gecentrifugeerd. De kleur van de nu heldere isoamylalcohol-pyridine oplossing werd gemeten tegen gedestilleerd water in een Kipp-Engel fotocolorimeter, in een 2 cm cuvet, filter S 53. De gemeten extinctie werd als TBA-waarde aangehouden.

De keuring van de partijjes boter geschiedde door een vijftal keurmeesters. Uit de door hen gegeven beoordelingen werden gemiddelde waarden vastgesteld. De boter van één bedrijf werd wegens de uitermate slechte bacteriologische gesteldheid uitgesloten van het vergelijkend onderzoek. Elke partij boter werd op de in tabel 39

Tabel 39. Overzicht van de TBA-waarden en van de organoleptische keuringsresultaten van 27 partijjes boter na bewaring gedurende . . weken bij  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Na . . weken	TBA-waarde			Organoleptische beoordeling		
	$\leq 0,080$	0,080-0,150	$> 0,150$	N*-IV	V-LT	T-ST
0	23	4	—	26	1	—
3	21	5	1	23	3	1
6	19	5	3	21	4	2
9	17	5	5	14	8	5
12	8	10	9	10	10	7
15	5	13	9	5	12	10
18	6	8	13	4	11	12
22	6	8	13	5	9	13

\* N = normaal; IV = iets vettig; V = vettig; LT = licht tranig; T = tranig; ST = sterk tranig

Table 39. Survey of the TBA-values and of the organoleptic scores of 27 butters after storage for . . weeks at  $-10^{\circ}\text{C}$ .

aangegeven tijdstippen geanalyseerd en organoleptisch beoordeeld. In totaal werden 216 TBA-bepalingen verricht. Als gemiddelde aanvangswaarde kan een extinctie van 0,060 worden gesteld. Voor de klassen normaal-iets vettig, vettig-licht tranig en tranig-sterk tranig werden extinctiewaarden aangehouden van resp.  $\leq 0,080$ , 0,080-0,150 en  $\geq 0,150$ . Geconstateerd werd dat de stijging in TBA-waarde aanvankelijk geheel voor rekening kwam van het boterserum.

De kwaliteit van de partijjes boter moet, gegeven de organoleptische beoordeling, slecht worden genoemd. Uit de tabel blijkt dat de resultaten van de organoleptische keuringen en de TBA-bepalingen bij dezelfde partijen boter tamelijk nauw correleren. De mening van RAMOS-CORDOVA en CONTRERAS, als zou de stijging in TBA-waarde een indicatie geven omtrent de houdbaarheid, kon echter niet worden bevestigd. Uit de waarnemingen kwam naar voren dat de toeneming in extinctiewaarde en de afneming in kwaliteit ongeveer gelijktijdig optreden. De indeling in bedrijven die goed en minder goed houdbare boter produceerden was weer afhankelijk van het kopergehalte van de boter. Evenzo bleek er, nadat de boter gedurende een aantal weken was bewaard, een correlatie te bestaan tussen de resp. kopergehalten van de partijjes boter en de TBA-waarden. In fig. 59 is dit verband nader aangegeven.

Fig. 59. Het verband tussen de kopergehalten van 27 partijtjes fabrieksboter van verschillende herkomst en de bij deze gehalten behorende TBA-waarden, na 18 weken bewaring van de boter bij  $-10^{\circ}\text{C}$ .

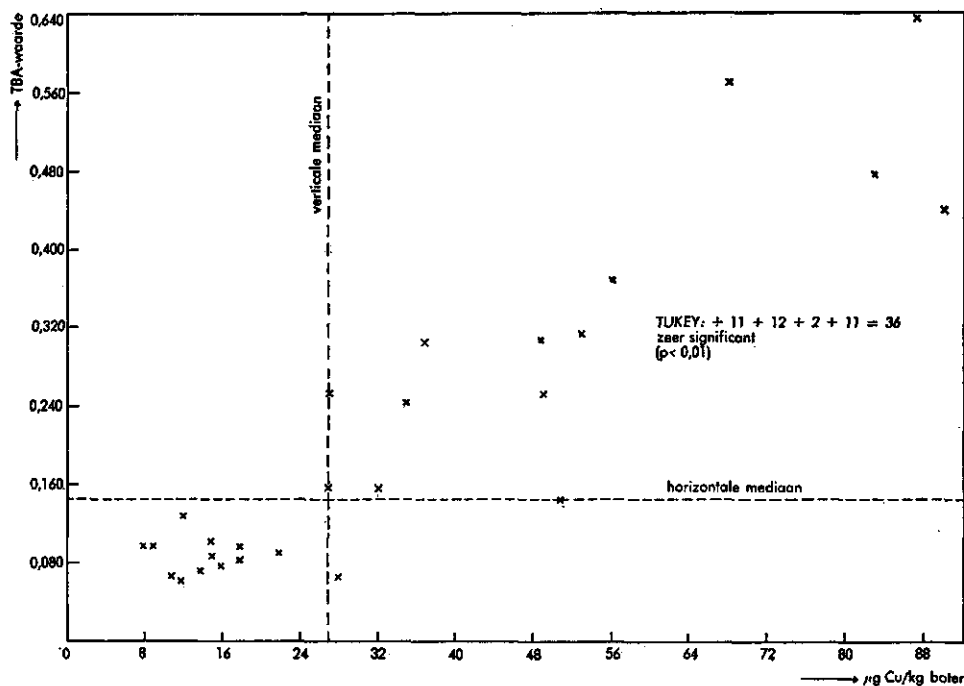


Fig. 59. Relation between the copper contents of 27 butters from different origin and the corresponding TBA-values after storage of the butter for 18 weeks at  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Als conclusie kan worden gesteld dat het niet mogelijk is aan de hand van TBA-waarden boter te selecteren voor opslag in het koelhuis, doch dat deze reactie ter ondersteuning van het organoleptische onderzoek zeer goed kan worden toegepast.



## SAMENVATTING

De reuk- en smaakafwijkingen die in koelhuisboter kunnen voorkomen zijn grotendeels van oxidatieve aard. De oorzaak van het ontstaan van deze zg. koelhuisgebreken moet voornamelijk worden gezocht in een koperbesmetting van de melk, de room of de boter. Het zuren van de room werkt het ontstaan van de gebreken in de hand. Ook de veranderingen die in de loop der jaren zijn aangebracht in de techniek van de boterbereiding, kunnen van belang zijn bij het ontstaan van reuk- en smaakafwijkingen.

Doel van dit onderzoek was om de belangrijkste factoren die invloed uitoefenen op het ontstaan van koelhuisgebreken nader te bestuderen en om zo mogelijk een samenhang te vinden van de invloed van deze factoren op de houdbaarheid van koelhuisboter. Voorts is getracht om aan te geven op welke wijze de kwaliteit van deze boter kan worden verbeterd.

In *Hoofdstuk I* wordt nader ingegaan op de processen die leiden tot het ontstaan van deze gebreken. Zoals o.a. uit onderzoekingen van MULDER (1947) naar voren is gekomen, treden de oxidatieprocessen op aan het grensvlak vet/serum, waarbij de aanwezigheid van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes van essentieel belang is. Uit onderzoekingen van VAN DER WAARDEN (1944, 1947) is gebleken dat koelhuisgebreken (vettig, tranig) ontstaan door oxidatie van onverzadigde vetzuren. Deze onverzadigde vetzuren zijn gelocaliseerd in het botervet en in de fosfatiden. Zowel de triglyceriden als de fosfatiden kunnen in principe worden beschouwd als potentiële bron voor het ontstaan van koelhuisgebreken. Uit de beschikbare literatuurgegevens komt echter naar voren dat de fosfatiden naar alle waarschijnlijkheid dienen te worden aangemerkt als oorzaak van het ontstaan van oxidatieve smaakafwijkingen.

De vluchtige reuk- en smaakstoffen van geoxideerde fosfatide-solen behoren tot verschillende groepen van carbonylverbindingen (VAN DUIN, 1960). Tranig-vissige smaken werden veroorzaakt door onverzadigde aldehyden met één dubbele binding (op een andere dan de  $\alpha$ - $\beta$  plaats) en door tweevoudig onverzadigde aldehyden met één dubbele binding op de  $\alpha$ - $\beta$  plaats en één op een andere dan de  $\gamma$ - $\delta$  plaats. Het in de fosfatiden aanwezige linoleenzuur dient daarbij als een belangrijke bron voor het ontstaan van tranigheid te worden beschouwd.

Over de factoren die invloed uitoefenen op het ontstaan van koelhuisgebreken kan worden opgemerkt dat de houdbaarheid van boter voornamelijk wordt bepaald door de mate van besmetting van de melk, room of boter met koper en door de pH van het boterserum. Uit onderzoekingen van MULDER (1949) is gebleken dat toevoeging van ijzer- en/of mangaanzouten nimmer aanleiding gaf tot het ontstaan van tranigheid. Toevoeging van zeer geringe hoeveelheden koper aan de room was voldoende om

binnen korte tijd het specifieke koelhuisgebrek te doen ontstaan. Daarnaast was de zuurheidsgraad van de room van grote invloed op de snelheid waarmee het oxidatieproces verliep (MULDER en KLEIKAMP, 1945). De wijze waarop deze beide factoren hun invloed doen gelden is echter tot nu toe niet opgehelderd.

Tenslotte werd in dit hoofdstuk nog aandacht besteed aan een aantal andere factoren die van belang zouden kunnen zijn bij het ontstaan van koelhuisgebreken.

In *Hoofdstuk II* worden resultaten vermeld van onderzoekingen naar de wijze waarop de fosfatiden in melk voorkomen en betreffende de winning van fosfatiden uit boter; verder over de samenstelling, de scheiding in componenten en de aanwezigheid van onverzadigde vetzuren in fosfatiden en in fosfatide-fracties. Daarnaast werden ook de onverzadigde vetzuren in het botervet in het onderzoek betrokken.

Volgens MULDER c.s. (1957) bevatten 100 g vetbolletjes ca. 600 mg fosfatiden; in het plasma kwamen per 100 g ca. 16 mg fosfatiden voor. Van de totale hoeveelheid fosfatiden in de melk is ongeveer 60% in het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes aanwezig, geassocieerd met eiwit.

Nadat werd gewezen op de moeilijkheden die zijn verbonden aan extractie van de fosfatiden uit melk, room of boter, werd nader ingegaan op de wijze waarop de fosfatiden uit boter worden geïsoleerd. De volgende methoden werden toegepast:

1. Röse-Gottlieb-extractie van boterserum, gevolgd door een enkele malen herhaalde precipitatie van het residu van het geconcentreerde ether-petroleumether-extract met aceton via een oplossing van de fosfatiden in chloroform (M1).

2. Extractie uit boterserum met ethanol-tetrachloorkoolstof, uitschudden van het geconcentreerde ethanol-tetrachloorkoolstof-extract met tetra, wassen met een oplossing van magnesiumchloride in water (0,25 M) en herhaalde precipitatie met aceton via een oplossing van de fosfatiden in tetra (M2).

3. Als onder 2, waarbij de aceton-procedure achterwege werd gelaten. Het ruwe, gewassen tetraextract werd chromatografisch gezuiverd (M3).

De samenstelling van de fosfatiden van boter werd nagegaan door een, niet met aceton behandeld, gewassen M2-extract van boterserum te analyseren. Het fosfatide-mengsel was als volgt samengesteld (in mol %): fosfatidylcholine (lecithine) 30, sfingomyeline 25, cefaline 45 (fosfatidylethanolamine 30, fosfatidylserine 10 en inositol bevattende fosfatiden 6). De hoeveelheid acetaalfosfatiden bedroeg 3,2% (1,0% als C<sub>16</sub>-aldehyde).

De scheiding van de fosfatiden werd bewerkstelligd door middel van chromatografie via aluminiumoxide en silicagel.

Bij het onderzoek naar de onverzadigde vetzuren van de fosfatiden en van de fosfatide-fracties werd gebruik gemaakt van de alkali-isomerisatiemethode. Uit de resultaten van de experimenten kwam naar voren dat de fosfatiden veel meer onverzadigde vetzuren bevatten dan de triglyceriden. De groep der cefalinen had een veel sterker onverzadigd karakter dan de lecithine-fractie; sfingomyeline bevatte vrijwel

geen onverzadigde vetzuren. Het gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren, zowel van het botervet en de fosfatiden, als van de fosfatide-fracties was in de zomermaanden het hoogst, uitgezonderd dat van de niet-geconjugeerde dicenzuren waarvan de top in de winter viel. Gezien het grote verschil in onverzadigdheid tussen de fosfatiden (cefaline) en het botervet, was het aannemelijk te veronderstellen dat de fosfatiden veel gevoeliger voor oxidatie zijn dan het botervet en dat de oxidatie dus zal aanvangen bij de fosfatiden. Deze hypothese werd in de hoofdstukken III en IV nader getoetst.

In *Hoofdstuk III* wordt aandacht besteed aan de oxidatie van fosfatiden en van botervet. Na toevoeging van koper aan room en bewaring van de room gedurende enkele dagen bij een temperatuur van 3°C, daalde het joodadditiegetal van de fosfatiden en bleef dat van het vet constant. Deze waarneming duidt er op dat het oxidatieproces in room zich in eerste instantie afspeelt aan het grensvlak vet/water.

Indien fosfatide-solen (pH 4,6) werden geschud trad zeer snel oxidatie op, waarbij aan vers botervet smaakstoffen konden worden overgedragen die sterk deden denken aan het smaakverloop van slecht houdbare koelhuisboter. Het botervet daarentegen was onder die omstandigheden stabiel.

De zuurstofabsorptie van emulsies van botervet en van fosfatide-solen werd nagegaan met behulp van de conventionele Warburg-methode. De zuurstofabsorptie van botervet (bepaald bij een pH-waarde van 4,6) werd versneld door toevoeging van koper; koper en eiwit samen hadden een grotere invloed dan koper alleen. Toegevoegd ijzer deed de zuurstofabsorptie veel sterker toenemen dan koper, doch de invloed van ijzer werd te niet gedaan indien eiwit in het systeem aanwezig was.

Fosfatide-solen oxideerden aanmerkelijk sneller dan emulsies van botervet. Indien de pH werd verlaagd nam de zuurstofabsorptie van fosfatiden aanzienlijk toe; koper versnelde de oxidatie. Deze twee factoren (pH en koper) bepalen eveneens grotendeels de houdbaarheid van boter in het koelhuis. Ook in fosfatide-solen werd toegevoegd ijzer volledig geïnactiveerd door eiwit. De invloed van koper en eiwit samen op de oxidatie van fosfatide-solen was daarentegen groter dan die van koper alleen.

De zuurstofabsorptie van vetvrije fosfatiden kwam vrijwel geheel voor rekening van de groep der cefalinen. De zuurstofabsorptie van lecithine-solen was gering, die van sfigomyeline nihil. Cefaline oxideerde ca. 400 maal zo snel als botervet. De resultaten van deze experimenten maken het aannemelijk te veronderstellen dat oxidatie van de fosfatiden aanvangt bij de cefaline-fractie.

De fosfatiden van boter zijn vrijwel geheel afkomstig van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes en komen daarin voor als een fosfatide-eiwitcomplex (lipoproteïne). Bovendien is een belangrijk deel van het in melk, room en boter aanwezige koper geassocieerd met het membraaneiwit. Om deze redenen werd het wenselijk geacht nader aandacht te besteden aan de oxidatie van het lipoproteïnecomplex.

In *Hoofdstuk IV* worden experimenten beschreven waarin de gevoeligheid voor oxi-

datie van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes werd nagegaan. Na een theoretische beschouwing over lipoproteïnen in het algemeen, werd ingegaan op de structurele opbouw van het oppervlaktelaagje van de melkvetbolletjes en werd een methode aangegeven om dit oppervlaktelaagje te isoleren uit gewassen room. Het bereide preparaat van het oppervlaktelaagje bevatte ca. 40% eiwit, 20% fosfatiden en 40% gebonden vet (voornamelijk triglyceriden met een zeer laag joodgetal). Gewezen werd op het feit dat uiteindelijk alleen de verbindingen die stevig aan het vetbolletje zijn gebonden konden worden geïsoleerd. Gaschromatografische analyses toonden aan dat het vetzuurpatroon van de membraanfosfatiden van boter uit gewassen room en dat van de fosfatiden van normale boter identiek waren.

De gevoeligheid van het oppervlaktelaagje voor oxidatie werd nagegaan met behulp van de Warburg-methode, waarbij de invloed van de volgende factoren op de zuurstofabsorptie werd bestudeerd: de pH, toevoeging van koper- en van andere ionen, toevoeging van eiwitten, de temperatuur en toevoeging van antioxidanten.

Wat betreft de invloed van de pH werd vastgesteld dat bij verlaging van de pH de zuurstofabsorptie aanzienlijk toenam. De maximale zuurstofabsorptie lag bij een pH-waarde van 3,8, het iso-elektrisch punt van de vetbolletjes. Ook het gebrek tranig bij boter uit gewassen room was bij deze pH-waarde het meest geprononceerd. De oxidatie van het oppervlaktelaagje verliep bij pH 3,8 ca. 10–20 maal zo snel als bij pH 6,6; de zuurstofabsorptie van het lipoproteïnecomplex was bij pH 3,8 ca. 7–11 maal groter dan die van eenzelfde hoeveelheid niet aan het membraaneiwit gebonden fosfatiden. Hierbij is de interactie tussen cefaline en het membraaneiwit, die bij deze pH een tegengestelde lading bezitten, van groot belang. Het gelukte om in boter uit gezuurde room, die was bereid onder uitsluiting van koperinfectie, tranigheid op te wekken door de te karnen room aan te zuren tot pH 3,8. Na toevoeging van TATD, waardoor het natuurlijke koper werd geïnactiveerd, traden onder deze omstandigheden geen koelhuisgebreken op.

Van een dertiental bij het onderzoek betrokken metaalzouten bevorderden alleen die van koper en ijzer de zuurstofabsorptie van het membraan. Toegevoegd ijzer wordt in het natuurlijke milieu echter opgenomen en geïnactiveerd door de plasmaeiwitten. Uit proeven met membraanpreparaten, geïsoleerd onder uitsluiting van koperinfectie, werd geconcludeerd dat zowel het natuurlijke als het toegevoegde koper katalytische activiteit bezit.

Gewassen room waaraan koper was toegevoegd werd bij pH 4,6 snel tranig; bij pH 6,6 was een verhitting van 10 min op temperaturen boven 60°C noodzakelijk om tranigheid te doen ontstaan.

Toevoeging van plasmaeiwitten aan suspensies van het oppervlaktelaagje deed de zuurstofabsorptie van het membraan niet toenemen. De remmende invloed van door verhitting geactiveerde sulphydrylgroepen ( $\beta$ -lactoglobuline) op de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje en op de oxidatieverschijnselen in gewassen room werd duidelijk vastgesteld.

De oxidatie van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes werd nagegaan bij ver-

schillende temperaturen. De activeringsenergie (pH 4,6) bedroeg ca. 12 kcal/mol, na toevoeging van koper daalde deze waarde tot ca. 9 kcal/mol. Het ontstaan van een tranige smaak in verhitte, gewassen room kon worden voorkomen door de gewassen room te verhitten in een atmosfeer van stikstof. Zuurstof verhoogde de intensiteit van de smaakafwijking.

Tenslotte werd nagegaan welke invloed een aantal antioxidanten hadden op de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje. Vastgesteld werd dat verbindingen die in staat zijn het koper te verwijderen van het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes, de zuurstofabsorptie volledig belemmerden. De remmende invloed van antioxidanten als NDGA, BHA en BHT op de zuurstofabsorptie van het oppervlaktelaagje berust op de direct remmende werking ten opzichte van de als kettingreactie verlopende autoxidatie.

In *Hoofdstuk V* wordt ingegaan op de wijze waarop koper voorkomt in melk, room en boter. Daarbij wordt speciaal aandacht besteed aan de invloed van de pH op de verdeling van het natuurlijke en het toegevoegde koper over de melkbestanddelen. De experimenten betreffende het toegevoegde koper werden verricht met radioactief koper (sulfaat). De resultaten van de onderzoeken laten zich als volgt samenvatten:

1. het kopergehalte van normale melk varieerde van 8–40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de hoeveelheid natuurlijk koper in het oppervlaktelaagje bedroeg 4–18  $\mu\text{g}/100\text{g}$  vetbolletjes, gemiddeld 11  $\mu\text{g}$ ;

2. het kopergehalte van nieuwe melk varieerde van 25–214  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de hoeveelheid natuurlijk koper in het oppervlaktelaagje bedroeg 4–22  $\mu\text{g}/100\text{g}$  vetbolletjes, gemiddeld eveneens 11  $\mu\text{g}$ ;

3. van het aan melk toegevoegde (radioactieve) koper werd 1–2% gebonden aan het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes;

4. indien melk werd aangezuurd tot een zeer lage pH-waarde en vervolgens geneutraliseerd (pH 6,6  $\rightarrow$  1,8  $\rightarrow$  6,6) nam het gehalte aan koper van het oppervlaktelaagje aanzienlijk toe (30–50% van de totale hoeveelheid koper in de melk);

5. het aanzuren van melk tot een pH-waarde van 4,6 had geen invloed op de verdeling van het natuurlijke koper;

6. als gevolg van het aanzuren van room tot een pH-waarde van 4,6 migreerde ca. 30–40% van het toegevoegde koper van de plasmaciwitten naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes;

7. in boter uit gezuurde room was vrijwel geen ionogeen koper aanwezig.

De goede houdbaarheid van boter (pH 4,6) bereid uit melk met een hoog gehalte aan natuurlijk koper (nieuwe melk; MENDER, 1961) kon worden verklaard op grond van de onder 1, 2 en 5 vermelde resultaten. De slechte houdbaarheid van boter (pH 4,6) bereid uit tot zeer lage pH-waarden gezuurde en daarna geneutraliseerde melk (pH 6,6  $\rightarrow$  1,8  $\rightarrow$  6,6; MENDER, 1961) werd veroorzaakt door migratie van een deel van het natuurlijk koper van de plasmaciwitten naar het oppervlaktelaagje (sub 4).

De binding van koper aan fosfatiden en aan eiwitten werd nagegaan door middel van de specificiteit van ionogeen koper met betrekking tot de oxidatie van een oplossing van ascorbinezuur. Deze oxidatie werd zowel manometrisch als titrimetrisch gevolgd. De resultaten werden uitgedrukt in enkele curven, die het verband aangeven tussen de logaritmen van verschillende concentraties aan ionogeen koper en de respectievelijke halfwaardetijden van een oplossing van ascorbinezuur. Vastgesteld werd dat fosfatiden bij pH 4,6 minder koper binden dan bij pH 6,8. De affiniteit van eiwitten voor koper was bij pH 6,8 het grootst voor het eiwit van het oppervlaktelaagje en nam voor natriumcaseïnaat,  $\alpha$ -lactalbumine en  $\beta$ -lactoglobuline geleidelijk af. Bij pH 4,6 bond het oppervlaktelaagje wederom de grootste hoeveelheid koper, gevolgd door  $\alpha$ -lactalbumine, natriumcaseïnaat en  $\beta$ -lactoglobuline. De plasmaeiwitten namen bij deze pH slechts een gedeelte van het toegevoegde koper op.

Als conclusie werd gesteld dat de invloed van een lage pH-waarde (4,6) en van toegevoegd koper op het ontstaan van koelhuisgebreken in boter zich op de volgende wijze manifesteren:

- a. toegenomen interactie tussen het voor zuurstof uitermate gevoelige cefaline en het koperbevattende membraaneiwit, waardoor de snelheid waarmede het lipoproteïne-complex oxideert, zeer snel toeneemt;
- b. migratie van een aanzienlijk deel van het toegevoegde koper van de plasmaeiwitten naar het membraaneiwit, waardoor de concentratie van het koper in het oppervlaktelaagje sterk wordt verhoogd.

In *Hoofdstuk VI* worden praktische maatregelen ter bestrijding van koelhuisgebreken besproken. Het ontstaan van oxidatieve smaakafwijkingen zou in principe kunnen worden voorkomen, c.q. vertraagd door:

- a. gehele of gedeeltelijke verwijdering van het lipoproteïnecomplex;
- b. het voorkomen of verminderen van migratie van het toegevoegde koper van de plasmaeiwitten naar het oppervlaktelaagje van de vetbolletjes;
- c. het doen ontstaan of toevoegen van antioxidanten.

Uit de onderzoeken bleek dat zonder toepassing van ingrijpende procedures, slechts in betrekkelijk geringe mate invloed kon worden uitgeoefend op de verwijdering van het lipoproteïnecomplex van de vetbolletjes.

Het elimineren van koperbesmetting was van beslissende invloed op de houdbaarheid van boter uit gezuurde room. Bij ruim 140 monsters boter, afkomstig van verschillende bedrijven, werd het verband nagegaan tussen het gehalte aan koper en de houdbaarheid bij  $-10^{\circ}\text{C}$ . Uit de resultaten werd berekend dat de gemiddelde kopergehalten van 9 maanden-oude koelhuisboter in de klassen normaal, vettig en tranig respectievelijk 16, 24 en  $34\text{ }\mu\text{g/kg}$  bedroegen. De grenzen die aan het kopergehalte van voor opslag bestemde boter zijn gesteld, zijn dus beslist te hoog.

Wat betreft het verminderen van de migratie van het toegevoegde koper kwam uit de resultaten van experimenten op laboratorium-, semitechnische en technische schaal naar voren dat verhoging van het vetgehalte van room, verkregen uit met koper

besmette melk, resulteerde in een lagere concentratie aan koper in het oppervlakte-laagje van de vetbolletjes bij pH 4,6, en diensgevolge in een betere houdbaarheid. De oorzaken van de verlaging van het kopergehalte werden aangegeven.

Het doen ontstaan van antioxidanten door verhitting van room (vorming van actieve sulfhydrylgroepen) is een veelvuldig toegepaste methode om de houdbaarheid van koelhuisboter te verbeteren. Onder normale bedrijfsomstandigheden, met mogelijke gevaren van besmetting met koper, kon echter geen correlatie worden aangetoond tussen de hoeveelheid SH-groepen en de houdbaarheid.

Het ontstaan van koelhuisgebreken kon worden voorkomen door toevoeging van zowel in vet als in water oplosbare verbindingen die in staat waren het koper te verwijderen van het oppervlakte-laagje van de vetbolletjes. In vet oplosbare antioxidanten die geen koper binden remden het ontstaan van koelhuisgebreken niet. Daarnaast kon ook door direct afvangen van de voor oxidatie benodigde zuurstof (via de waterfase), de primaire oxidatie aan het grensvlak vet/water worden uitgesteld.

Tenslotte werd nog aandacht besteed aan het vroegtijdig aantonen van oxidatief bederf. Het was echter niet mogelijk aan de hand van TBA-waarden boter te selecteren voor opslag in het koelhuis.

## SUMMARY

Flavour defects which may develop in cold stored butter made from ripened cream are usually of an oxidative character. These so-called cold storage defects are caused mainly by contamination of the milk, cream or butter with copper. The ripening of cream promotes the development of this defect. Changes in relation to butter making may be of importance in the origin of the oxidative defects.

The scope of this investigation was to study the most important factors which have an effect upon the development of these defects, i.e. copper and pH, to find, if possible, a connection between these two factors in relation to keeping quality and to attempt to show how improvements in production could lead to better keeping quality.

*Chapter I* deals with a survey of the literature. From this it can be concluded (see a.o. MULDER, 1947) that oxidation takes place at the fat/serum interface, in which the presence of the fat globule membrane is an essential factor. VAN DER WAARDEN (1944, 1947) showed that cold storage defects are caused by oxidation of unsaturated fatty acids. These fatty acids occur both in butter fat and in phospholipids, so that triglycerides as well as phospholipids can be regarded as the source of the development of cold storage defects. It is evident however from the literature, that the phospholipids must be considered as the major cause of the development of these oxidative defects.

The volatile flavour components of oxidized phospholipids belong to different classes of carbonyl compounds (VAN DUIN, 1960). Trainy-fishy flavours are caused by unsaturated aldehydes with a non- $\alpha$ - $\beta$  double bond and by two double bonds containing aldehydes with one double bond in the  $\alpha$ - $\beta$  position and one in a position other than  $\gamma$ - $\delta$ . Linolenic acid, originating from the phospholipids, must be considered as an important source for the development of trainy flavour.

The keeping quality of cold stored butter mainly depends on the extent of contamination of milk, cream or butter with copper and on the pH of butter serum. MULDER (1949) showed that addition of salts of iron and/or manganese never lead to the development of trainy flavour. On the other hand, the addition of small amounts of copper to cream was sufficient to cause cold storage defects within a short time. In addition it was found that cream acidity had a pronounced influence on the rate of oxidation (MULDER and KLEIKAMP, 1945). However, the manner in which these two factors operate in butter has never been explained.

Finally in this chapter some other factors were considered which may be of importance in the development of cold storage defects.

In *Chapter II* results are given on investigations concerning the partition of phospho-



lipids between the fat and water phases of milk, methods of extraction from butter, composition, separation into individual components and the presence of unsaturated fatty acids in phospholipids, phospholipid-fractions and in butter fat.

According to MULDER (1957) the fat globules and the milk plasma contain 600 and 16 mg of phospholipids per 100 g respectively. About 60% of the total amount of phospholipids in milk occurs in the fat globule membrane, associated with protein.

Three methods were developed for the extraction of phospholipids. Briefly, the principles of these methods were:

1. Röse-Gottlieb extraction of butter serum, followed by repeated precipitation of the evaporated ether-petrol ether extract with acetone from a solution of the phospholipids in chloroform (M1).

2. Extraction from butter serum with ethanol-carbon tetrachloride, extraction of the evaporated solution with carbon tetrachloride, washing with a 0,25 M solution of magnesium chloride and repeated precipitation with acetone from a solution of the phospholipids in carbon tetrachloride (M2).

3. As under 2, omitting the precipitation. The crude, washed extract was purified by column chromatography (M3).

The composition of butter phospholipids was determined by analyzing a washed M2-extract, which had not been treated with acetone. Total phospholipids of butter contained (in moles %); phosphatidylcholine (lecithin) 30, sphingomyelin 25, cephalin 45 (phosphatidylethanolamine 30, phosphatidylserine 10, lipid bound inositol 6) and plasmalogens 3. Separation of the phospholipids into the individual components was achieved by chromatography on aluminium oxide and silica gel respectively.

Unsaturated fatty acids of the phospholipids and of the phospholipid fractions were determined by alkali isomerisation. Phospholipids were much more highly unsaturated than the triglycerides. The content of unsaturated fatty acids of the cephalin fraction was much higher than that of lecithin. On the other hand sphingomyelin contained practically no unsaturated fatty acids. The level of unsaturation of butter fat, phospholipids and of phospholipid fractions was highest in summer, except that of the non-conjugated dienoic acids which had their maximum in winter. From the results of these experiments it seems that phospholipids are much more susceptible to oxidation than is butter fat and that oxidation starts with the phospholipids. This hypothesis was investigated in Chapters III and IV.

*Chapter III* deals with the oxidation of phospholipids and of butter fat. The iodine addition number of phospholipids from cream to which copper had been added, decreased on storage at 3°C, while that of the butter fat remained constant. This observation indicates that oxidation starts in cream at the fat/water interface.

On shaking phospholipid sols at pH 4,6, oxidation proceeded very rapidly. Flavour compounds which resembled those of cold stored butter of poor keeping quality, could be transferred to fresh butter fat. On the other hand, emulsions of butter fat were stable in these experiments.

The oxygen absorption of butter fat emulsions and of phospholipid sols was determined by the conventional Warburg-method. The rate of oxidation of butter fat at pH 4,6 was increased by the addition of copper, but oxidation was accelerated to a greater degree by copper together with protein than by copper alone. Added iron had much more effect on the oxygen consumption than copper, but iron was inactivated by added protein.

Phospholipid sols were oxidized much more rapidly than were emulsions of butter fat. With decreasing pH, oxygen consumption increased appreciably, and copper accelerated the rate of oxidation. These two factors (pH and copper) also determine the keeping quality of cold stored butter. In phospholipid sols too, added iron was inactivated by protein. The effect of copper in combination with protein on the oxidation of phospholipid sols was much greater than of copper alone.

Concerning the phospholipid fractions, it was observed that the oxygen consumption of non-P-lipid free phospholipids could nearly all be accounted for by cephalin. The rate of oxidation of lecithin sols was slow, that of sphingomyelin nil. The cephalin fraction was oxidized about 400 times faster than was butter fat. It was concluded from these experiments that oxidation of the phospholipids starts with the cephalin fraction.

The phospholipids of butter nearly all originate from the phospholipid-protein complex of the fat globule membrane, with which a part of the copper in milk, cream and butter is associated. It therefore appeared necessary to pay attention to the oxidation of this complex.

In *Chapter IV* experiments are described in which the susceptibility of the fat globule membrane to oxidation was studied. After a brief survey of the literature on lipoproteins in general, the structural composition of the fat globule membrane was discussed and a method was given of the preparation of this membrane from washed cream. Preparations of the surface layer contained about 40% protein, 20% phospholipids and 40% bound fat (mainly triglycerides with a very low iodine addition number). It was stressed that only those substances which were firmly attached to the fat globules were isolated. Gas chromatographic analysis showed no difference between the fatty acid pattern of membrane phospholipids of butter prepared from washed cream and that of phospholipids from normal butter.

The susceptibility of the fat globule membrane to oxidation was studied by the conventional Warburg-method. The following factors were considered: influence of pH, addition of copper and other ions, addition of protein, influence of temperature and addition of antioxidants.

It was found that by lowering the pH, the oxygen consumption increased considerably; the maximum oxygen consumption was at pH 3,8, the iso-electric point of the fat globules. At this pH value trainy flavour of butter made from washed cream was also most pronounced. The rate of oxidation of the fat globule membrane at pH 3,8 was 10-20 times faster than at pH 6,6, whereas at pH 3,8 the lipoprotein complex absorbed

oxygen 7–11 times faster than the same amount of protein-free membrane phospholipids. Physical-chemical interaction between cephalin and membrane protein, which are oppositely charged at this pH value, is involved in this phenomenon. It was possible to develop trainy flavour in butter made from normal cultured cream, which was not contaminated with copper, merely by acidifying the cream to a pH value of 3.8. After addition of a copper binding agent (TETD) the natural copper was inactivated, and no trainy flavour developed.

The influence of 13 different metal salts on oxygen consumption by the fat globule membrane was studied. Only those of copper and iron accelerated the oxidation of the lipoprotein complex. Added iron, however, is normally inactivated by plasma proteins. From experiments with membrane preparations, uncontaminated with copper, it was concluded that both natural and added copper have catalytic activity.

Washed cream containing added copper readily turns trainy at pH 4.6, but at a pH value of 6.6, heating at temperatures above 60°C for 10 minutes is necessary to develop trainy flavour.

Addition of plasma proteins to fat globule membrane suspensions did not increase the oxygen consumption. The inhibitory effect of activated sulfhydryl groups ( $\beta$ -lactoglobulin) on the oxygen consumption of membrane suspensions and on the oxidation in washed cream was observed.

Oxidation of the fat globule membrane was studied at different temperatures. The energy of activation (pH 4.6) amounted to 12 kcal/mol; after addition of copper this value decreased to 9 kcal/mol. The development of trainy flavour in heated washed cream could be blocked by heating the washed cream in an atmosphere of nitrogen. Trainy flavour was enhanced by heating under oxygen.

Finally the influence of a number of antioxidants on the oxygen consumption of the fat globule membrane was studied. It was shown that oxidation of the membrane phospholipids was blocked by addition of those copper chelating agents which were able to remove the copper from the membrane. The influence of the primary antioxidants like NDGA, BHA and BHT on the oxygen consumption of the membrane is based on the direct inhibiting action with regard to the autoxidation chain reaction.

*Chapter V* deals with the distribution of copper in milk, cream and butter. Special attention was paid to the influence of pH on the partition of natural and of added copper in the milk constituents. The experiments with added copper were carried out with radioactive copper (sulphate). The results of the investigations can be summarized as follows:

1. The copper content of normal milk varied from 8–40  $\mu\text{g/kg}$ ; the quantity of natural copper in the fat globule membrane amounted to 4–18  $\mu\text{g/100 g}$  of fat globules, on the average 11  $\mu\text{g}$ .
2. The copper content of early lactation milk (first 14 days) varied from 25–214  $\mu\text{g/kg}$ ; the quantity of natural copper in the fat globule membrane amounted to 4–22  $\mu\text{g/100 g}$  of fat globules, on the average 11  $\mu\text{g}$ .

3. 1–2% of the added (radioactive) copper to milk was bound by the fat globule membrane.

4. If milk was neutralized subsequent to acidification to a very low pH value (pH 6,6→1,8→6,6), the content of copper in the fat globule membrane increased considerably (30–50% of the total amount of copper in milk).

5. Acidification of milk to a pH value of 4,6 did not affect the partition of natural copper in milk.

6. As a result of acidification of milk or cream to pH 4,6, about 30–40% of the added copper shifted from the plasma proteins to the fat globule membrane.

7. Practically no ionic copper could be detected in butter serum at pH 4,6.

The good keeping quality of butter (pH 4,6) made from early lactation milk with a high natural copper content (MENDER, 1961), could be explained on results 1, 2 and 5 given above. The bad keeping quality of butter (pH 4,6) made from strongly acidified and neutralized milk (pH 6,6→1,8→6,6; MENDER, 1961) was caused by migration of part of the natural copper from the plasma proteins to the fat globule membrane (see 4 above).

The binding of copper to phospholipids and to proteins was studied by means of the specificity of ionic copper in catalyzing the oxidation of ascorbic acid. This oxidation was followed manometrically as well as by a titrimetric procedure. The results obtained were given in the form of graphs, indicating the relation between the logarithms of various copper ion concentrations and the half oxidation times of a solution of ascorbic acid. It was found that phospholipids bind less copper at pH 4,6 than at pH 6,8. The affinity of proteins to copper at pH 6,8 decreased in the order: fat globule membrane protein, sodium caseinate,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. At pH 4,6 the order was: fat globule membrane protein,  $\alpha$ -lactalbumin, sodium caseinate and  $\beta$ -lactoglobulin. Only part of the added copper was adsorbed by the plasma proteins at pH 4,6.

It was concluded that the influence of a low pH value (4,6) and of added copper on the development of cold storage defects in butter find expression in the following way:

a. Enhanced interaction between cephalin from the membrane phospholipids, which is highly susceptible to oxygen, and the copper containing membrane protein. As a result of this, the rate of oxidation of the lipoprotein complex increases considerably.

b. The concentration of copper in the membrane rises appreciably, caused by migration of a considerable part of the plasma protein-bound added copper to the membrane protein.

In *Chapter VI* practical measures to prevent cold storage defects were considered. In principle it should be possible to prevent or delay the development of oxidative off-flavours by:

a. Complete or partial removal of the lipoprotein complex.

b. Prevention or decrease of migration of the added copper from the plasma proteins to the fat globule membrane.

c. Creation or addition of antioxidants.

As a result of the experiments it appeared that, without the application of most unusual measures, removal of the lipoprotein complex from the fat globule could be effected only to a slight extent.

Prevention of contamination with copper proved to be the crucial factor in relation to good keeping quality. More than 140 samples of butter from different factories were analyzed for copper content and keeping quality at  $-10^{\circ}\text{C}$ . From the results it was calculated that the average contents of copper from 9 months old cold stored butter in the classes normal, fatty and trainy amounted to 16, 24 and 34  $\mu\text{g/kg}$  butter respectively. This implies that the present limits for the copper content of butter for cold storage are absolutely too high.

The results of experiments on a laboratory, semi-technical, and technical scale with butter (pH 4,6), made from cream with a high and with a low fat content, both derived from the same copper contaminated milk, indicated that as a result of the lower copper concentration in the fat globule membrane of the high fat cream at pH 4,6, butter made from that cream had a better keeping quality than butter made from low fat cream. The causes of the decrease in copper content were given.

Creation of antioxidants by heating cream (development of active sulphydryl groups) is often applied to improve the keeping quality of cold stored butter. However, under normal conditions, where copper contamination might occur, no correlation could be established between the amount of SH-groups and keeping quality.

The development of cold storage defects could be prevented by addition of those fat or water soluble compounds which were able to remove the copper from the fat globule membrane.

Fat soluble antioxidants which did not bind copper did not prevent the development of trainy flavour. The primary oxidation at the fat/water interface could be delayed by addition of water soluble antioxidants which reacted the oxygen required for oxidation.

Finally, attention was paid to the early detection of oxidative deterioration. It was not possible to select butter for cold storage by regular determinations of TBA values.

## LITERATUUR

1. AAS, G. & BORGES, T., *Meieriposten* 30 (1941) 357.
2. ALIFAX, R., *La technique laitière* (1957) nr. 235 p. 9.
3. ALLAN, J. E., *J. Dairy Res.* 17 (1950) 54.
4. ALLPORT, N. L. & GARRATT, D. C., *J. Soc. Chem. Ind.* 67 (1948) 382.
5. ARCHIBALD, J. G., *Dairy Sci. Abstr.* 20 (1958) 712, 800.
6. AURAND, L. W. & WOODS, A. E., *J. Dairy Sci.* 42 (1959) 1111.
7. AURAND, L. W., WOODS, A. E. & ROBERTS, W. M., *J. Dairy Sci.* 42 (1959) 961.
8. AXELROD, J., REICHENTHAL, J. & BRODIE, B. B., *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 903.
9. BADINGS, H. T., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 36 (1959) 648.
10. BADINGS, H. T., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 14 (1960) 215.
11. BADINGS, H. T. & KOOPS, J., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 62 (1960) 302.
12. BADINGS, H. T., *Persoonlijke mededelingen* (1960).
13. BADINGS, H. T., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 16 (1962) 217.
14. BALIGA, B. S. & BASU, K. P., *Indian J. Dairy Sci.* 8 (1955) 119; 9 (1956) 24, 95.
15. BARAKAT, M. Z., ABD EL-WAKAB, M. F. & EL-SADR, M. M., *Analyt. Chem.* 27 (1955) 536.
16. BARNICOAT, C. R., *J. Dairy Res.* 6 (1935) 397; 8 (1937) 15.
17. BARRON, E. S. G., DE MEIO, R. H. & KLEMPERER, F., *J. Biol. Chem.* 112 (1935/36) 625.
18. BARRON, E. S. G., BARRON, A. G. & KLEMPERER, F., *J. Biol. Chem.* 116 (1936) 563.
19. BATEMAN, L., *Quart. Revs. London* 8 (1954) 147.
20. BAUD, C. A., *Acta anat.* 17 (1953) 113.
21. BAWN, C. E. H., PENNINGTON, A. A. & TIPPER, C. F. H., *Discussions Faraday Soc.* 10 (1951) 282.
22. BAWN, C. E. H., *Discussions Faraday Soc.* 14 (1953) 181.
23. BERGSTRÖM, S., *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* 21 A (1945) no. 14, 1.
24. BERNHEIM, F., BERNHEIM, M. L. C. & WILBUR, K. M., *J. Biol. Chem.* 174 (1948) 257.
25. BIGGS, D. A. & BRYANT, L. R., *Can. J. Technol.* 31 (1953) 138.
26. *BIOCHEMICAL Preparations*, Vol. 4 (1955) 23; Vol. 1 (1949) 22.
27. BLAAUW, J. & RAADSVELD, C. W., *Off. Org. FNZ* 53 (1961) 399, 401.
28. BLIX, G., TISELIUS, A. & SVENSON, H., *J. Biol. Chem.* 137 (1941) 485.
29. BLOOR, W. R., *J. Biol. Chem.* 17 (1914) 377.
30. BLOOR, W. R., *J. Biol. Chem.* 22 (1915) 133.
31. BÖHM, P. & RICHARZ, G., *Z. physiol. Chem.* 298 (1954) 110.
32. BROWN, W. C., DUSTMAN, R. B. & THURSTON, L. M., *J. Dairy Sci.* 20 (1937) 599.
33. BROWN, W. C., DUSTMAN, R. B. & WEAKLY, C. E., *J. Dairy Sci.* 24 (1941) 265.
34. BRUNNER, J. R., DUNCAN, C. W., TROUT, G. M. & MACKENZIE, M., *Food Res.* 18 (1953) 469.
35. BRUNNER, J. R. & HERALD, C. T., *J. Dairy Sci.* 41 (1958) 1489.
36. BURUANA, L. & FURTUNESCO, A., *Lait* 21 (1941) 8.
37. CAMPLING, J. D. & NIXON, D. A., *J. Physiol.* 126 (1954) 71.
38. CANNON, J. A., ZILICH, K. T., BURKET, S. C. & DUTTON, H. J., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 29 (1952) 447.
39. CARLSON, A., *Clin. Chim. Acta* 5 (1960) 528.
40. CHANG, S. S. & KUMMEROW, F. A., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 30 (1953) 251.
41. CHEVALLIER, A., BURG, C. & MANUEL, S., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 31 (1949) 381.
42. COHN, E. J., *Discussions Faraday Soc.* 6 (1949) 92.
43. COHN, E. J., STRONG, L. E., HUGHES, W. L. JR., MULFORD, D. J., ASHWORTH, J. N., MELIN, M. & TAYLOR, H. L., *J. Am. Med. Soc.* 68 (1946) 459.
44. CORBETT, W. J. & TRACY, P. H., *J. Dairy Sci.* 26 (1943) 419.
45. CRAIG, B. M. & MURTY, N. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 36 (1959) 549.

46. CRESPI, H. L., Physicochemical Studies of Serum Lipoproteins. Diss. Univ. Ill. 1955.
47. DAHLE, C. D. & PALMER, L. S., Pa. Agr. Exp. Sta. Bull. 347 (1937).
48. DAHLE, L. K., HILL, E. G. & HOLMAN, R. T., Arch. Biochem. and Biophys. 98 (1962) 253.
49. DANIELLI, J. F., PANKHURST, K. G. A. & RIDELIFORD, A. C., Surface Phenomena in Chemistry and Biology. Pergamon Press London 1958 p. 246.
50. DAVIES, W. L., J. Dairy Res. 4 (1933) 255.
51. DAVIES, W. L. & GILL, E., J. Soc. Chem. Ind. (London) Trans. 55 (1936) 141.
52. DAVIES, W. L. & MATTICK, A. T. R., Nature 121 (1928) 324.
53. DAVISSON, E. O., Diss. Univ. Ill. 1953(cit. Crespi).
54. DEUTSCH, H. F., KLINE, B. E. & RUSCH, H. P., J. Biol. Chem. 141 (1941) 529.
55. DEYS, W. B. & BOSMAN, M. S. M., Med. No. 85 van het IBS, Wageningen 1959.
56. DLUZEWSKA, A., Die Nahrung 3 (1959) 200.
57. DOTY, P. & SCHULMAN, J. H., Discussions Faraday Soc. 6 (1949) 21.
58. DUIN, H. VAN, Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 12 (1958) 74, 81, 90.
59. DUIN, H. VAN, Off. Org. FNZ 52 (1960) 597.
60. DUIN, H. VAN. Bijdrage tot de vloeistof-vloeistof verdelingschromatografie der alifaten. Diss. V.U. A'dam 1961a.
61. DUIN, H. VAN, Off. Org. FNZ 53 (1961b) 331.
62. DUIN, H. VAN, Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 17 (1963), in de pers.
63. DUNKLEY, W. L., Food Technol. 5 (1951) 342.
64. DUTTON, H. J., J. Am. Oil Chem. Soc. 26 (1949) 441.
65. EL-RAFEY, M. S., RICHARDSON, G. A. & HENDERSON, J. L., J. Dairy Sci. 27 (1944) 807.
66. ENTENMAN, C., TAUROG, A. & CHAIKOFF, I. L., J. Biol. Chem. 155 (1944) 13.
67. EVANS, C. D., SCHWAB, A. W. & CORNEY, P. M., J. Am. Oil Chem. Soc. 31 (1954) 9.
68. FAULKNER, R. N., J. Appl. Chem. 8 (1958) 448.
69. FIESS, H. A. & KLOTZ, J. M., J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) 887.
70. FISKE, A. M., MADSON, H. & JANSEN, K., 105 Beretn. fra. Sta. forsøgsmejeri (1955-'56) 46.
71. FNZ Verzamelrapport Commissie voor bewaringsproeven (1933-'38) met boter.
72. FNZ Rapport 1949. Koelhuisgebreken van boter. Een onderzoek naar de invloed van zuurstof bij het ontstaan van koelhuisgebreken van boter.
73. FNZ Rapport 1959. Het wel of niet wassen van boter.
74. FOLCH, J., J. Biol. Chem. 146 (1942) 35.
75. FOLCH, J., J. Biol. Chem. 174 (1948) 439.
76. FORMUNE, P., PONTIE, N. J., ROBBARD, J. A. & BORGHOLS, A. J., Clin. Chim. Acta 2 (1957) 25.
77. FORSS, D. A., PONT, E. G. & STARK, W., J. Dairy Res. 22 (1955) 91, 345.
78. FORSS, D. A., DUNSTONE, E. A. & STARK, W., J. Dairy Res. 27 (1960a) 211; 27 (1960b) 373; 27 (1960c) 381.
79. FORSTER, T. L., JENSEN, C. & PLATH, E., J. Dairy Sci. 36 (1953) 98.
80. FRASER, M. J., J. Pharm. and Pharmacol. 9 (1957) 497.
81. FUGGER, J., CANNON, J. A., ZILCH, K. T. & DUTTON, H. J., J. Am. Oil Chem. Soc. 28 (1951) 285.
82. GANDER, K. F., Über die antioxygene Wirkung von Milch und Rinderblutserum in Fett-emulsionen. Diss. Techn. Hochschule, Karlsruhe 1955.
83. GARRETT, O. F., J. Dairy Sci. 24 (1941) 103.
84. GOFMAN, J. W., LINDGREN, F. T. & ELLIOTT, H., J. Biol. Chem. 179 (1949) 973.
85. GREENAWALD, F. M., Ind. Engng. Chem. 46 (1954) 570.
86. GREENBANK, G. R., Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm 2 (1949) 284.
87. GREENBANK, G. R. & PALLANSCH, M. J., J. Dairy Sci. 44 (1961) 1597.
88. GRISWOLD, B. L., HUMOLLER, F. L. & MCINTYRE, A. R., Anal. Chem. 23 I (1951) 192.
89. GUNSTONE, F. D. & HILDITCH, T. P., J. Chem. Soc. (London) 1946, 1022.
90. HACK, M. H., J. Biol. Chem. 169 (1947) 137.
91. HAEFTEN, F. E. VAN & PETTE, J. W., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague 2 (1953a) 541.
92. HAEFTEN, F. E. VAN & PETTE, J. W., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 7 (1953b) 41.
93. HANAHAN, D. J., DITTMER, J. C. & WARASHINA, E., J. Biol. Chem. 228 (1957) 685.
94. HANDEL, E. VAN, The Chemistry of Phosphoaminolipids. Diss. G. U. A'dam 1954.
95. HANSSON, E., Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm 2 (1949) 27.

96. HARTMANN, S., *Proc. Intern. Congr. Pure and Appl. Chem. XIth Congr. London 1947* 3 (1951) 93-96.
97. HARTMANS, J., *Landbouwwoorl.* 17 (1960) 679.
98. HAWTHORNE, J. N., *Biochem. J.* 59 (1956) 11.
99. HEINEMANN, B., *J. Dairy Sci.* 22 (1939) 707.
100. HENDERSON, J. L. & ROADHOUSE, C. L., *J. Dairy Sci.* 17 (1934) 321.
101. HENICK, A. S., *Food Technol.* 5 (1951) 145.
102. HERALD, C. T. & BRUNNER, J. R., *J. Dairy Sci.* 40 (1957) 948.
103. HERB, S. F., MAGIDMAN, P. & RIFMENSCHNEIDER, R. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37 (1960) 127.
104. HERB, S. F. & RIEMENSCHNEIDER, R. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 29 (1952) 456.
105. HESS, A. F. & HOLMAN, F. D., *J. Biol. Chem.* 64 (1925) 81.
106. HIETARANTA, M., *Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm 2* (1949) 472.
107. HIETARANTA, M., *Meyeritietteenlinen Aikakauskirja XI* (1949) No. 1.
108. HILDITCH, T. P., *The Chemical Constitution of Natural Fats*, 2nd ed. (1947) p. 124.
109. HOFFMANN, G., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38 (1961) 1.
110. HOLM, U. & WODE, G., *Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm 2* (1949) 325.
111. HOLM, U., WODE, G. & THOMÉ, K. E., *Medd. Sta. Mejeriförsök nr.* 37 (1952).
112. HOLM, G. E., WRIGHT, P. A. & DEYSHER, E. F., *J. Dairy Sci.* 19 (1936) 631.
113. HOLMAN, R. T., LUNDBERG, W. O. & MALKIN, T., *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids II* (1954) 60.
114. HOLMAN, R. T. & ELMER, O. C., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 24 (1917) 127.
115. HOLWERDA, B. J., *Versl. Landbouwk. Onderz.* No. 42 (C) 1936, 335.
116. HUGHES, TH. R. & KLOTZ, J. M., *Methods of Biochemical Analysis Vol. III* (1952) 265.
117. INSULL, W. & AHRENS, E. H., *Biochem. J.* 72 (1959) 27.
118. JENNESS, R. & PALMER, L. S., *J. Dairy Sci.* 28 (1945a) 611.
119. JENNESS, R. & PALMER, L. S., *J. Dairy Sci.* 28 (1945b) 653.
120. JOSEPHSON, D. V. & DOAN, F. J., *Milk Dealer* 29 (1939) 35, 54.
121. JUKES, T. H., *J. Biol. Chem.* 107 (1934) 783.
122. KAUFFMAN, F. L., WEISS, T. J. & LEE, G. D., *Abstr. of Papers Am. Chem. Soc. 138th Meeting, Sept. 11-16, 1960* 2 A No. 6.
123. KEESTRA, F., *Koelhuisboterproef 1956 Z.K.B. Onderzoek betreffende de duurzaamheid van koelhuisboter.*
124. KEESTRA, F., *Off. Org. FNZ* 43 (1951) 175, 608.
125. KEKWICK, R. A. & CANNAN, R. K., *Biochem. J.* 30 (1936) 227.
126. KENDE, S., *Milchw. Forsch.* 13 (1932) 111.
127. KIERMEIER, F. & STEGER, H., *Zeitschr. Lebensm. Unters. und Forsch.* 115 (1961) 410.
128. KING, N., *The Milk Fat Globule Membrane and Some Associated Phenomena 1955. Techn. Comm. no. 2, Commonwealth Bureau of Dairy Sci.*
129. KING, R. L., *Variation and Distribution of Copper in Milk in Relation to Oxidized Flavor. Diss. Univ. Calif.* 1958.
130. KING, R. L. & DUNKLEY, W. L., *J. Dairy Sci.* 42 (1959) 420.
131. KING, R. L., LUICK, J. R., LITMANN, I. I., JENNINGS, W. G. & DUNKLEY, W. L., *J. Dairy Sci.* 42 (1959) 780.
132. KLOTZ, I. M. & CURME, H. G., *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 939.
133. KLOTZ, I. M., FALLER, I. L. & URQUHART, J. M., *J. Phys. and Colloid Chem.* 54 (1950) 18.
134. KLOTZ, I. M. & FIESS, H. A., *J. Phys. and Colloid Chem.* 55 (1951) 101.
135. KLOTZ, I. M., URQUHART, J. M. & FIESS, H. A., *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 5537.
136. KNOOP, E., WORTMANN, A. & KNOOP, A. M., *Proc. XVth Intern. Dairy Congr. London Vol. 2* (3) (1959) 1004.
137. KOEHLER, L. H., *Anal. Chem.* 24 (1952) 1576.
138. KOOPS, J. & PETTE, J. W., *Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome Vol. II (I)* (1956) 168.
139. KOOPS, J., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 11 (1957a) 43.
140. KOOPS, J., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 11 (1957b) 53.
141. KOOPS, J., *Chem. Weekblad* 53 (1957c) 406.
142. KOOPS, J., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 12 (1958) 226.
143. KOOPS, J. & TARASSUK, N. P., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 13 (1959) 180.



144. KOOPS, J., TARASSUK, N. P. & PETTE, J. W., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 13 (1959) 279.
145. KOOPS, J., Off. Org. FNZ 52 (1960a) 333.
146. KOOPS, J., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 14 (1960b) 243.
147. KOPPEJAN, C. A. & MULDER, H., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague III (1953) 1400.
148. KOTOVA, O. G., Proc. XVth Intern. Dairy Congr. London II (1959) 1121.
149. KRUISHEER, C. I., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 9 (1955) 275.
150. KRUISHEER, C. I. & HERDER, P. C. DEN, Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 6 (1952) 109.
151. KRUISHEER, C. I. & KROL, B. M., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 9 (1955) 173.
152. KRUKOVSKY, V. N., J. Dairy Sci. 35 (1952) 21.
153. KRUKOVSKY, V. N. & LOOSLI, J. K., J. Dairy Sci. 35 (1952) 834.
154. KRUKOVSKY, V. N., LOOSLI, J. K. & WHITING, F., J. Dairy Sci. 32 (1949) 196.
155. KRUKOVSKY, V. N., WHITING, F. & LOOSLI, J. K., J. Dairy Sci. 33 (1950) 791.
156. KURTZ, F. E., JAMESON, G. S. & HOLM, G. E., J. Biol. Chem. 106 (1934) 407, 717.
157. LARSON, B. L. & JENNESS, R., J. Dairy Sci. 33 (1950) 890, 896.
158. LEA, C. H., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague III (1953a) 1037.
159. LEA, C. H., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague IV (1953b) 315.
160. LEA, C. H., Chem. and Ind. 1953, p. 1303.
161. LEA, C. H. & RHODES, D. N., Biochem. J. 54 (1953) 467.
162. LEVINE, C. & CHARGAFF, E., J. Biol. Chem. 192 (1951) 472.
163. LING, R. E., A Textbook of Dairy Chemistry, Vol. I London 1946.
164. LOFTUS HILLS, G., Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm 2 (1949) 302.
165. LONCIN, M. & JACQMAIN, D., Fette, Seifen, Anstrichmittel 61 (1959) 1055.
166. MABROUK, A. F. & DUGAN, L. R., J. Am. Oil Chem. Soc. 37 (1960) 486.
167. MACHEBOEUF, M., Bull. Soc. Chim. biol. 11 (1929) 268, 485.
168. MALM, B., Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome 2 (1) (1956) 231.
169. MALM, B. & HILDINGSON, B., Svenska Mejeritidn. 47 (1955) 469.
170. MANNECK, H., Die Verhinderung des Fettverderbes bei Ernährungs- und technischen Fetten und Fettprodukten 1954, 1956, 1960.
171. MASEK, J., MAXA, V. & VEDLICH, M., Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome 2 (1) (1956) 246.
172. MATTSSON, S., Report no. 26 State Dairy Res. Station Alnarp, Sweden 1949.
173. MATTSSON, S., THOMÉ, K. E. & SWARTLING, P., Report no. 35 State Dairy Res. Station Alnarp, Sweden 1951a.
174. MATTSSON, S., THOMÉ, K. E. & SWARTLING, P., Report no. 33 State Dairy Res. Station Alnarp, Sweden 1951b.
175. McDOWELL, A. K. R., J. Dairy Res. 25 (1958) 192.
176. McDOWELL, F. H., SINGLETON, J. A. & O'DEA, J. J., N.Z. J. of Sci. and Techn. 35 (1953) 175.
177. McKIBBIN, J. M., J. Biol. Chem. 220 (1956) 537.
178. MENDER, J. W., De invloed van koper, ijzer en mangaan bij het ontstaan van koelhuisgebreken van boter. Diss. L.H.S. Wageningen 1961.
179. MENDER, J. W. & MULDER, H., Landbouwk. Tijdschr. 69 (1957) 111.
180. MEYKNECHT, E. A. M. & DAM, B. VAN, Proc. XVth Intern. Dairy Congr. London 2 (1959) 1108.
181. MOHR, W., Fette und Seifen 47 (1940) 388.
182. MOHR, W. & ARBES, A., Fette und Seifen 46 (1939) 678.
183. MOHR, W. & KOENEN, K., Die Butter. Milchw. Verlag Th. Mann, K. G., Hildesheim 1958.
184. MORTON, R. K., Biochem. J. 57 (1954) 231.
185. MOYER, L. S., J. Biol. Chem. 133 (1940) 29.
186. MUKHERJEE, S., J. Am. Oil Chem. Soc. 32 (1955) 351.
187. MULDER, H., Versl. Landbouwk. Onderz. 48 (1952) 709.
188. MULDER, H., Problemen en resultaten bij wetenschappelijk zuivelonderzoek. Deel I FNZ 1947.
189. MULDER, H., Problemen en resultaten bij wetenschappelijk zuivelonderzoek. Deel II FNZ 1947.
190. MULDER, H., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 11 (1957) 197.
191. MULDER, H. & KLEIKAMP, J. H. B., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 1 (1947) 225.
192. MULDER, H. & KOPPEJAN, C. A., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague III (1953) 1402.
193. MULDER, H., KRUISHEER, C. I., HERDER, P. C. DEN & GINKEL, J. G. VAN, Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 8 (1949) 37.
194. MULDER, H., KLEIKAMP, J. H. B. & KING, N., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 1 (1947) 219.

195. MULDER, H. & MENDER, J. W., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 12 (1958) 1.
196. MULDER, H., MENDER, J. W. & KOOPS, J., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 11 (1957) 263.
197. MULDER, H. & ZUIDHOF, T. A., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 12 (1958) 173.
198. MULLER, L. L., Queensland J. of Agric. Sci. 12 (1955) 1.
199. NAGAE, S., SUKEGAWA, K. & TANEYA, S., Rep. Res. Lab., Snow Brand Milk Prod., Japan no. 38 (1957).
200. OKUHARA, E. & NAKAYAMA, T., J. Biol. Chem. 215 (1955) 295.
201. OLLEY, J., Federation Proc. 16 (1957) (3) 816.
202. OVERBEEK, J. TH. G. & BUNGENBERG DE JONG, H. G., in: Kruyt, H.R., Colloid Science II p. 192. Elsevier Publ. Co. 1949.
203. PAGE, I. H. & BÜLOW, M., Z. Physiol. Chemie 231 (1935) 10.
204. PALMER, L. S. & RIMPILA, C. E., J. Dairy Sci. 18 (1935) 827.
205. PALMER, L. S. & TARASSUK, N. P., J. Dairy Sci. 22 (1939) 542.
206. PALMER, L. S. & WIESE, H. F., J. Dairy Sci. 15 (1932) 371; 16 (1933) 41; 17 (1934) 29.
207. PATTERSON, J. M. & RIDOUT, J. G., Arch. Biochem. Biophys. 78 (1958) 546.
208. PAYENS, T. A. J., Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 13 (1959) 237.
209. PERRIN, D. R., LIGHTFOOT, F. R. & MOIR, G. M., J. Dairy Res. 18 (1951) 77.
210. PETTE, J. W., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm II (1949) 572.
211. PIKAAR, N. A., De bepaling van de vetzuren in bloedserum. Diss. R.U. Utrecht 1957.
212. PIRAUX, E., JAMOTTE, P., LACROSSE, R., LHEUREUX, F., DE BRIEY, TH. & PIROT, Y., Bull. Int. agron. Gembloux, 24 (1956a) 307.
213. PIRAUX, E., JAMOTTE, P., LHEUREUX, F. & LACROSSE, R., Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome 2 (1) (1956b) 341.
214. PLATON, B., OLSSON, T. & THOMÉ, K. E., Medd. Sta. Mejeriförsök, Alnarp no. 16 (1945).
215. PONT, E. G., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague III (1953a) 1049.
216. PONT, E. G., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague IV (1953b) 320.
217. PONT, E. G., J. Dairy Res. 27 (1960) 121.
218. PONT, E. G., FORSS, D. A., DUNSTONE, E. A. & GUNNIS, L. F., J. Dairy Res. 27 (1960) 205.
219. PONT, E. G. & GUNNIS, L. F., Austr. J. Dairy Technol. 13 (1958) 68.
220. PRIVETT, O. S. & LUNDBERG, W. O., J. Am. Oil Chem. Soc. 28 (1951) 313.
221. PRIVETT, O. S., LUNDBERG, W. O., KHAN, N. A., TOLBERG, W. E. & WHEELER, D. E., J. Am. Oil Chem. Soc. 30 (1953) 61.
222. PYANOWSKI, E., HABAJ, B. & HYZIAK, B., Bull. Acad. pol. Sci. Varsovie 4 (1956) 383.
223. PYANOWSKI, E., HABAJ, B. & HYZIAK, B., Roczn. Tech. Chem. Zywn. 1 (1957) 35.
224. PYCK, J., HOSTE, J. & GILLIS, J., Proc. Intern. Symp. on Microchem. Birmingham 1958, p. 48.
225. RAADSVELD, C. W., Landbouwk. Tijdschr. 69 (1957) 117.
226. RAADSVELD, C. W., Off. Org. FNZ 51 (1959) 275.
227. RADEMA, L., Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome I (2) (1956) 403.
228. RADSMA, W. & GRONINGEN, H. E. M. VAN, Acta Physiol. Pharmacol. Neerlandica 8 (1959) 15.
229. RAMOS-CORDOVA, M. & CONTRERAS, L. F., Proc. XVth Intern. Dairy Congr. London III (1959) 1790.
230. RAPPORT, M. M., LERNER, B., ALONZO, N. & FRANZL, R. E., J. Biol. Chem. 225 (1957) 859.
231. RHODES, D. N. & LEA, C. H., Nature 177 (1956) 1129.
232. RHODES, D. N. & LEA, C. H., Biochem. J. 65 (1957) 526.
233. RHODES, D. N. & LEA, C. H., J. Dairy Res. 25 (1958) 60.
234. REINART, A., Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm II (1949) 382.
235. RICCIUTI, C., COLEMAN, J. E. & WILLITS, C. O., Anal. Chem. 27 (1955) 405.
236. RIEL, R. R., Causative Factors and End-Products of Oxidized Flavor Development in Milk. Thesis Univ. Wisconsin 1952.
237. RIEL, R. R. & GIBSON, C. A., J. Dairy Sci. 41 (1958) 624.
238. RIMPILA, C. E. & PALMER, L. S., J. Dairy Sci. 18 (1935) 827.
239. RITTER, W. & NUSSBAUMER, TH., Schweiz. Milch Ztg. 65 (1939) 193.
240. ROGERS, L. A., Wisconsin Buttermaker's Assoc. Proc. 13 (1914) 70.
241. ROUSER, G., BERRY, J. F., MARINETTI, G. & STOTZ, E., J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 310.
242. SAAL, R. N. J. & HEUKELOM, W., Versl. Landbouwk. Onderz. 52 (1946) 53.
243. SAAL, R. N. J. & HEUKELOM, W., Off. Org. FNZ 39 (1947a) 30.

244. SAAL, R. N. J. & HEUKELOM, W., Monographs on the Progress of Research in Holland (1947b), p. 115.
245. SABALITSCHKA, T., *Milchwissenschaft* 8 (1953) 300.
246. SCHÄFER, K. H., BREYER, A. M., HORST, W., KARTE, H. & LENZ, W., *Klin. Wochenschr.* 34 (1956) 300.
247. SCHAUMLÖFFEL, E., Über die Bestimmung kleinster Mengen Kupfer und dessen Aufnahme durch die Pflanze. Diss. Univ. Gießen 1958.
248. SCHEELE, Z., *Z. Anal. Chem.* 105 (1936) 259.
249. SCHEELMAN, J. H., *Biochem. J.* 39 (1945) LIV.
250. SCOTT, W. E., HERB, S. F., MAGIDMAN, P. & RIEMENSCHNEIDER, R. W., *J. Agric. Food Chem.* 7 (1959) 125.
251. SEDIVEC, V. & VASAK, V., *Coll. Czech. chem. Comm.* 15 (1950) 260.
252. SJÖSTRÖM, G. & LARSSON, A., *Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm* 2 (1949) 368.
253. SMITH, A. C., LOEWENSTEIN, M., ANDERSON, R. E. & OLSEN, H. C., *J. Dairy Sci.* 36 (1952) 485.
254. SMITH, G. J. & DUNKLEY, W. L., *J. Dairy Sci.* 45 (1962) 170.
255. SMITH, L. M., *J. Dairy Sci.* 44 (1961) 607.
256. SMITH, L. M., FRANKEL, E. N., HAAB, W. & JACK, F. L., *J. Dairy Sci.* 41 (1958) 472.
257. SMITH, L. M. & JACK, E. L., *J. Dairy Sci.* 42 (1959) 767.
258. SMITH, L. M. & LOWRY, R. R., *J. Dairy Sci.* 45 (1962) 581.
259. STADHOUDERS, J. & MULDER, H., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 9 (1955) 182.
260. STADHOUDERS, J. & MULDER, H., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 10 (1956) 53.
261. STARK, W. & FORSS, D. A., *J. Dairy Res.* 29 (1962) 173.
262. STEBNITZ, V. C. & SOMMER, H. H., *Oil and Soap* 14 (1937) 228.
263. STORGÅRDS, T. & AULE, O., *Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome* 2 (1) (1956) 448.
264. STORGÅRDS, T. & HIETARANTA, M., *Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm* 2 (2) (1949) 389.
265. STULL, J. W., HERREID, E. O. & TRACY, P. H., *J. Dairy Sci.* 34 (1951) 181, 187.
266. SUPPLEE, G. C., *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir* 29 (1919) 101.
267. SWAIN, M. L. & BRICE, B. A., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 26 (1949) 272.
268. SWARTLING, P., *Proc. XIIth Intern. Dairy Congr. Stockholm* II (1949) 375.
269. SWARTLING, P. & MATSSON, S., *Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome* III (2) (1956) 633.
270. SWARTLING, P., OLSSON, T. & BUHRGARD, A. B., *Proc. XIVth Intern. Dairy Congr. Rome* 2 (1) (1956) 473.
271. SWERN, D. & COLEMAN, J. E., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 32 (1955) 700.
272. TAPPEL, A. L., *Arch. Biochem. and Biophys.* 44 (1953) 378.
273. TAPPEL, A. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 32 (1955) 252.
274. TARASSUK, N. P. & KOOPS, J., *J. Dairy Sci.* 43 (1960) 93.
275. TARASSUK, N. P., KOOPS, J. & PETTE, J. W., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 13 (1959) 258.
276. TARLADGIS, B. G., PEARSON, A. M. & DUGAN, L. R., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39 (1962) 34.
277. TARLADGIS, B. G. & WATTS, B. M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37 (1960) 403.
278. TÄUFEL, K. & ZIMMERMANN, R., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 63 (1961) 226.
279. THOMÉ, K. E., *Proc. XIIIth Intern. Dairy Congr. The Hague* IV (1953) 233.
280. THOMÉ, K. E., OLSSON, T., LODIN, L. O. & BUHRGARD, A. B., *Medd. Sta. Mejeriförsök Alnarp* 32 (1951).
281. THOMPSON, M. P., BRUNNER, J. R. & STINE, C. M., *J. Dairy Sci.* 42 (1959) 1651.
282. THOMPSON, M. P., BRUNNER, J. R., STINE, C. M. & LINQUIST, K., *J. Dairy Sci.* 44 (1961) 1589.
283. THOMPSON, I. R. & STEENBOCK, H., *Arch. of Biochem.* 4 (1944) 15.
284. THURSTON, L. M., BROWN, W. C. & DUSTMAN, R. B., *J. Dairy Sci.* 18 (1935) 301.
285. TOLLENAAR, F. D., Bestrijding van koelhuisgebreken van boter met behulp van antioxidanten, in het bijzonder met tetra-alkylthiuramdisulfiden. Diss. R.U. Utrecht 1953.
286. TOWNLEY, R. C. & GOULD, I. A., *J. Dairy Sci.* 26 (1943) 689.
287. TREVELYAN, W. E., PROCTER, D. P. & HARRISON, J. P., *Nature* 166 (1950) 444.
288. UNDERKOFER, L. A., *Conserva* 9 (1960) 149.
289. VAUQUELIN, M., *Ann. Chim.* 81 (1812) 37.
290. VIRTANEN, A. I., *Meyeritiet. Aikakausk.* 1 (1945) 32.
291. VOGEL, A. J., *A Textbook of Practical Organic Chemistry*. London 1954.

292. WAARDEN, M. VAN DER, Versl. Landbouwk. Onderz. nr. 50 (2) G (1944).
293. WAARDEN, M. VAN DER, Monogr. on the Progress of Research in Holland (1947).
294. WAARDEN, M. VAN DER, Versl. Alg. Ned. Zuivelbond. 's-Gravenhage, 1945-7 p. 3 (1948).
295. WALLING, CH., Free Radicals in Solution. New York Wiley J. Inc. 1957 p. 39.
296. WALSTRA, P. & GRAAF, J. J. DE, Ned. Melk- en Zuiveltijdschr. 16 (1962) 283.
297. WHITE, A. H., RIEL, R. R., BEATTIE, D. M., SMITH, K. N. & MCGUGAN, W. A., Can. Dairy and Ice Cream J. 36 (1957) 25.
298. WILEY, W. J., J. Dairy Res. 10 (1939) 300.
299. WILLITS, C. O., RICCIUTI, C., KNIGHT, H. B. & SWERN, D., Anal. Chem. 24 (1952) 785.
300. WITTENBERG, J. B., KOREY, S. R. & SWENSON, F. H., J. Biol. Chem. 219 (1956) 39.
301. WITTING, L. A., CHANG, S. S. & KUMMEROW, F. A., J. Am. Oil Chem. Soc. 34 (1957) 470.
302. YOUNATHAN, M. T. & WATTS, B. M., Food Res. 25 (1960) 538.
303. YSTGAARD, O. M. & KORVALD, T., Meieriposten 45 (1956) 609, 635.
304. Z.K.B. Verslagen 1946 t/m 1961.